

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS FÍSICAS CON  
ORIENTACIÓN EN MEDICINA Y BIOLOGÍA

**CALENTAMIENTO DE NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS MEDIANTE UN CAMPO MAGNÉTICO  
AC EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE (MODELO  
CELULAR): EXPERIMENTOS IN-VITRO**

**Caterina Lamperti**

**Dr. Roberto Zysler**  
Director

**Miembros del Jurado**

Dr. Emilio De Biasi - Dr. Mauricio Sica - Dr. Marcelo Vásquez Mansilla

Noviembre 2018

Laboratorio Resonancias Magnéticas

Instituto Balseiro  
Universidad Nacional de Cuyo  
Comisión Nacional de Energía Atómica  
Argentina

*A mi abuelo Jorge y a mi amigo Andrés,  
cuyas palabras me motivaron en los momentos  
más difíciles de mi carrera.*

# Índice de contenidos

Índice de contenidos	ii
Índice de figuras	iv
Resumen	vii
<b>1. Introducción y motivación</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.1.1. Tiempo característico . . . . .	3
1.1.2. Hipertermia . . . . .	5
1.2. Plan de acción . . . . .	5
<b>2. Nanopartículas magnéticas</b>	<b>6</b>
2.1. Síntesis . . . . .	6
2.2. Limpieza . . . . .	7
2.3. Funcionalización . . . . .	7
2.4. Caracterización . . . . .	8
2.4.1. Fast Fourier Infrared Spectroscopy (FTIR) . . . . .	8
2.4.2. Dynamic Light Scattering (DLS) . . . . .	8
2.4.3. Termogravimetría (TGA) . . . . .	8
2.4.4. Caracterización magnética . . . . .	9
2.4.5. Hipertermia . . . . .	9
2.5. Partículas utilizadas . . . . .	10
<b>3. Modelo celular</b>	<b>11</b>
3.1. Medio de cultivo . . . . .	12
3.2. Selección de la línea celular . . . . .	12
3.3. Cámara de NeuBauer . . . . .	13
3.4. Protocolo de descongelado y siembra del cultivo celular . . . . .	14
3.5. Ajuste del modelo celular . . . . .	15
3.5.1. Curva de crecimiento . . . . .	15

---

3.5.2. Protocolo de viabilidad . . . . .	17
<b>4. Prueba de concepto</b>	<b>19</b>
4.1. Funcionalización . . . . .	20
4.1.1. Distribución de tamaños . . . . .	23
4.1.2. Caracterización magnética . . . . .	24
4.1.3. Purificación e incubación de las levaduras . . . . .	28
<b>5. Caracterización de las partículas sintetizadas</b>	<b>32</b>
5.0.1. Síntesis de partículas de Magnetita . . . . .	32
5.0.2. Síntesis de partículas de Ferrita de Zinc (CatZn) . . . . .	36
<b>6. Hipertermia magnética</b>	<b>43</b>
6.1. Primer ensayo . . . . .	43
6.2. Segundo ensayo . . . . .	44
6.3. Tercer ensayo . . . . .	45
6.4. Cuarto ensayo . . . . .	46
<b>7. Conclusiones</b>	<b>49</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>52</b>



# Índice de figuras

1.1. Esquema de los dominios magnéticos dentro de un material. . . . .	2
1.2. Zonas de transición entre los dominios, conocidas como paredes de dominio	3
2.1. Esquema del dispositivo utilizado para realizar las síntesis de nano- partículas. . . . .	6
3.1. Cultivo de levaduras <i>saccharomyces cerevisiae</i> . En el interior de cada una de ella pueden verse organelas y un gran núcleo. . . . .	11
3.2. Se muestra una fotografía del estriado realizado sobre YPD con agregado de agar. Se observa un círculo señalando la posición de la colonia retirada para empezar el cultivo patrón. . . . .	13
3.3. (a) Cámara de NeuBauer utilizada. Las zonas coloreadas son aquellas en que se encuentran grabadas las gradillas en las que se realizan los conteos celulares. (b) Esquema de la gradilla grabada en las zonas señaladas. (c) Esquema de un cuadrante de la gradilla indicando el orden en que se realiza el conteo. . . . .	14
3.4. Promedio de las mediciones realizadas sobre ambos cultivos. Se presenta la densidad celular según el conteo en cámara de NeuBauer en función del tiempo. . . . .	15
3.5. Mediciones correspondientes a las primeras 10 horas. En este caso se observa claramente el crecimiento exponencial. . . . .	16
3.6. OD en función de la densidad celular del cultivo. Se presenta el ajuste correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. . . . .	16

3.7. A la izquierda se observan células de <i>saccharomyces cerevisiae</i> vivas en azul de metileno al 1 %. Se observan refringentes, claras y con su forma y tamaño habitual. A la derecha, se presenta el mismo tipo de células, esta vez equidecentes, bajo las mismas condiciones. En este caso se observa que las células se encuentran teñidas por el colorante. Además, la pared celular resulta oscurecida y el tamaño promedio es ligeramente menor. Por todo esto, se considera que estas células no se encuentran metabólicamente activas. . . . .	18
4.1. Espectro FTIR de partículas de $Fe_3O_4$ con recubrimiento de ácido oleico.	20
4.2. Espectro FTIR de partículas de $Fe_3O_4$ desnudas . . . . .	21
4.3. Espectro FTIR de dextrán antes de colocar en solución a pH 12 . . . . .	21
4.4. Espectro FTIR de dextrán luego de colocar en solución a pH 12 . . . . .	22
4.5. Espectro FTIR de partículas de $Fe_3O_4$ luego de realizar el recubrimiento con dextrán. . . . .	22
4.6. Mediciones de los diámetros realizadas por dispersión de luz (DLS). Se observan los diámetros medios de aglomerados de partículas recubiertas en dextrán (rosa), desnudas (violeta) y recubiertas en ácido oleico (gris)	23
4.7. Magnetización en función de la temperatura para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán a campo fijo en 200 <i>Gauss</i> . . . . .	24
4.8. Magnetización en función del campo para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán medida a $T = 100\ K$ . . . . .	25
4.9. Magnetización en función del campo para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán medida a $T = 150\ K$ . . . . .	26
4.10. Magnetización en función del campo para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán medida a $T = 200\ K$ . . . . .	26
4.11. Magnetización en función del campo para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán medida a $T = 250\ K$ . . . . .	27
4.12. Magnetización en función del campo para $Fe_3O_4$ recubierta por dextrán medida a $T = 300\ K$ . . . . .	27
4.13. Magnetización de saturación del sistema en función de la temperatura.	28
4.14. Se observa a la izquierda el cultivo de levaduras con agregado de nanopartículas y a la derecha el cultivo de control. Puede notarse un ligero cambio en la coloración . . . . .	29
4.15. Cultivo de levadura sin agregado de nanopartículas bajo el aumento 100x	29
4.16. Se observa el cultivo de levadura con agregado de nanopartículas bajo el aumento 100x . . . . .	30

4.17. Medición en VSM realizada sobre levaduras del cultivo control ( <i>negro</i> ) y levaduras alimentadas con partículas de $Fe_3O_4$ recubiertas en dextrán ( <i>rosa</i> ). . . . .	30
5.1. Espectro FTIR de partículas de magnetita en proceso de limpieza. Se observa todavía ácido oleico. . . . .	33
5.2. Espectro FTIR de partículas de magnetitas limpias. . . . .	34
5.3. Magnetización en función del campo para temperatura de 300 K. Se observa el comportamiento superparamagnético. . . . .	34
5.4. Magnetización en función de temperatura para un campo de 200 Gauss. Se observa un cambio claro en el comportamiento debido a la transición de Verwey. . . . .	35
5.5. Evolución de la temperatura de partículas de magnetita en una suspensión acuosa en función del tiempo para un campo AC de 200 Gauss. . .	36
5.6. Espectro FTIR de partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa. . .	37
5.7. Imagen de las partículas de ferrita de zinc tomada por medio de TEM. . .	38
5.8. Medición mediante DLS de partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa. Se observan dos diámetros característicos. . . . .	38
5.9. Termogravimetría realizada sobre partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa. . . . .	39
5.10. Magnetización de partículas de ferrita de zinc en función del campo para una temperatura de 300 K. . . . .	40
5.11. Magnetización de partículas de ferrita de zinc en función de la temperatura para un campo aplicado de 200 Gauss. . . . .	40
5.12. Medición de temperatura en función del tiempo para partículas de ferrita de zinc en agua al aplicar un campo magnético AC de 200 Gauss y 575 kHz. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . .	41
5.13. Medición de temperatura en función del tiempo para partículas de ferrita de zinc en medio de cultivo YPD al aplicar un campo magnético AC de 200 Gauss y 575 kHz. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . . . .	42
6.1. Evolución de la temperatura en función del tiempo sobre una alícuota de cada cultivo. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . . . .	44
6.2. Evolución de la temperatura en función del tiempo para el cultivo II centrifugado. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . . . .	45

---

6.3. Evolución de la temperatura en función del tiempo para los cultivos centrifugados. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . . . .	46
6.4. Evolución de la temperatura en función del tiempo para los cultivos centrifugados. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado. . . . .	47

# Resumen

*“All we have to decide is what to do with the time that is given us.”*

— J. R. R. Tolkien

El objetivo de este trabajo es estudiar el fenómeno de hipertermia mediante un campo magnético externo aplicado sobre nanopartículas magnéticas dentro de un modelo celular. Para este fin es necesario, como primera etapa, un estudio de la incorporación de las nanopartículas a las células. Para esto se decidió utilizar como modelo a levaduras *saccharomyces cerevisiae*.

Se sintetizaron partículas de distintas composiciones. Cada una de ellas pasó por un proceso de funcionalización que resulta en un *coating* de azúcar sobre las mismas. Los azúcares utilizados fueron dextrosa y glucosa.

El proceso de funcionalización pudo comprobarse mediante espectros de reflexión de luz infrarroja. Se estudió mediante dispersión de luz la variación del diámetro de los aglomerados que refleja la variación en la interacción de las partículas debida a los recubrimientos. Se caracterizaron magnéticamente las partículas utilizando un magnetómetro de muestra vibrante.

Se purificó y cultivó una línea celular de levaduras. Para su conservación, se la congeló en suspensión 50 % glicerol. Se verificó la incorporación de las nanopartículas a las células a partir del comportamiento magnético de las levaduras.

Se obtuvieron resultados positivos de calentamiento y muerte celular para partículas de óxido de hierro dopadas con cinc recubiertas por glucosa. La temperatura alcanzada fue de 55 °C. Se comprobó que la muerte por toxicidad de estas partículas corresponde al 0,003 % de la *densidad celular*.

**Palabras clave:** HIPERTERMIA - NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS - SACCHAROMYCES CEREVISIAE

# Capítulo 1

## Introducción y motivación

*“Set your goals high, and don’t stop ’till you get there.”*

— Bo Jackson.

### 1.1. Motivación

Las nanopartículas magnéticas presentan interesantes aplicaciones en biomedicina. Sus dimensiones se encuentran en el orden de unos pocos nanómetros hasta algunas decenas, tamaño mucho menor a los de las células, que están entre 10 y 100  $\mu m$ , y es comparable al de los virus, de entre 20 y 450 nm, las proteínas, de entre 5 y 50 nm, o un gen de 2 nm de ancho y entre 10 y 100 nm de longitud [1].

Las partículas pueden ser recubiertas por moléculas biocompatibles para hacerlas interactuar con entidades biológicas [2],[3]. Además, por ser magnéticas, pueden manipularse mediante un gradiente de campo magnético externo.

Esta “acción a distancia”, combinada con la penetrabilidad de los campos magnéticos en los tejidos humanos, abre una serie de posibles aplicaciones que incluyen transporte y/o inmovilización de partículas magnéticas o entidades biológicas específicas.

Además, las partículas pueden responder a la acción de un campo magnético variable en el tiempo, resultando en la transferencia de energía por la excitación de la partícula magnética debida al campo aplicado. La partícula puede entonces ser calentada, permitiendo el tratamiento por hipertermia. Este consiste en la entrega de energía térmica a niveles elevados, nocivos para las células objetivo como pueden ser las pertenecientes a tumores.

## Principios físicos

La descripción de la magnetización para  $N$  momentos magnéticos no interactuantes por unidad de volumen está dada por la *función de Brillouin*

$$B_J(x) = \frac{2J+1}{2J} \operatorname{ctanh}\left(\frac{(2J+1)x}{2J}\right) - \frac{1}{2J} \operatorname{ctanh}\left(\frac{x}{2J}\right) \quad (1.1)$$

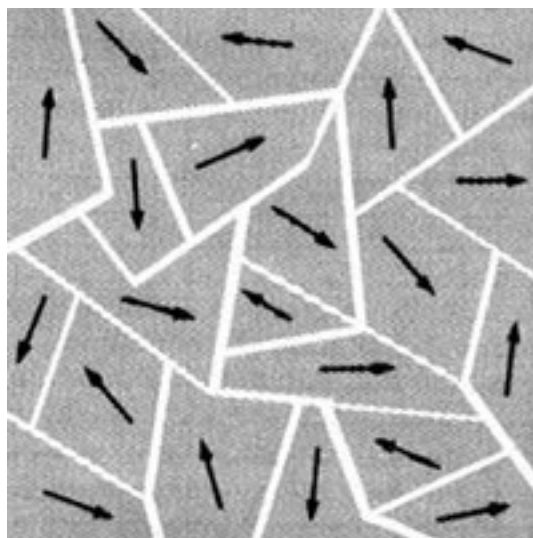
donde  $J$  es el momento angular total de cada momento. Para casos en que el campo sea pequeño o la temperatura muy alta,  $x = \frac{\mu H}{k_B T} \ll 1$ . Bajo estas condiciones puede aproximarse

$$\operatorname{ctanh}(x) = \frac{1}{x} + \frac{x}{3} \quad (1.2)$$

llegando a la forma dada por la *Ley de Curie* [4]. Esta indica que la relación de la magnetización  $M$  con la temperatura y el campo aplicado es de la forma  $M = \chi H$  siendo  $\chi$  la susceptibilidad magnética con  $\chi = C/T$  donde  $C = \frac{N\mu^2}{3k_B T}$  la constante de Curie, específica para cada material. La unidad de  $M$  en el sistema cgs es el *emu*, equivalente a  $A/m$  en el SI.

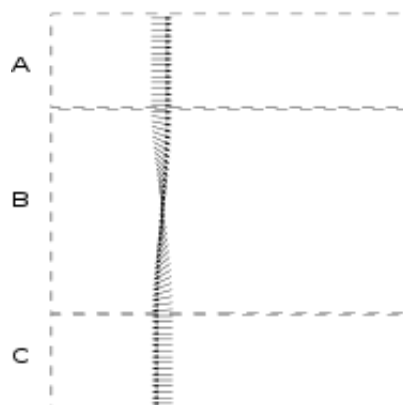
Algunos materiales con momentos magnéticos interactuantes presentan estados de orden magnético incluso sin un campo magnético aplicado. Esto permite clasificarlos en ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos según la naturaleza de la interacción de acoplamiento entre los electrones dentro del material. Este acoplamiento puede dar lugar a grandes magnetizaciones inherentes al material.

Los momentos magnéticos ordenados de un material forman los llamados dominios magnéticos que corresponden a zonas en que estas regiones ordenadas magnéticamente lo hacen en diferentes direcciones, como se muestra en la Fig. 1.1.



**Figura 1.1:** Esquema de los dominios magnéticos dentro de un material.

La separación entre ellos está dada por las *paredes de dominio*, que corresponden a zonas delgadas de transición entre los dominios. En ellas, se observa una variación gradual en la orientación de los momentos magnéticos, yendo desde la orientación de un dominio hasta la del otro como se observa en la Fig. 1.2. Esta disposición es tal que la energía magnética total del material resulta minimizada. Por lo tanto, puede ocurrir que un material disponga sus dominios de manera que la magnetización neta sea nula, o puede darse la situación en que energéticamente convenga un monodominio, dando una magnetización neta diferente de cero.



**Figura 1.2:** Zonas de transición entre los dominios, conocidas como paredes de dominio

Las paredes de dominio se encuentran en el orden nanométrico, por lo que materiales de estas dimensiones el estado de menor energía es conformar un monodominio. Por lo tanto, las nanopartículas presentan naturalmente un momento magnético  $\mu$  y una dirección de anisotropía. El momento magnético resulta mucho mayor a los momentos magnéticos de los iones que conforman el dominio.



### 1.1.1. Tiempo característico

Entre las posiciones de equilibrio estable para la magnetización de la partícula, existe una barrera de energía debida a la anisotropía intrínseca de la misma, dada por su estructura cristalina, su forma y su superficie. La evidencia experimental muestra que en general las partículas presentan una anisotropía efectiva con simetría uniaxial dada por  $\Delta E = KV$ , donde  $K$  es la densidad de energía de anisotropía y  $V$  es el volumen de la partícula.

Esta proporcionalidad directa entre  $\Delta E$  y el volumen es importante para partículas pequeñas en las cuales  $\Delta E$  es comparable con  $k_B T$  a temperatura ambiente.

Al aplicar un campo magnético, la magnetización de la partícula tenderá a alinearse con el mismo, pero no lo logra seguir en fase. Como resultado, se obtiene un ciclo con histéresis; la potencia promedio absorbida será igual al área de este ciclo por la frecuencia.

Existen dos mecanismos de *relajación magnética* mediante los cuales la magnetización se invierte. Uno de ellos es el mecanismo de relajación de Brown. Es aquel para el cual la magnetización se encuentra fijada a la partícula y, para invertirla, deberá rotar la partícula completa. En este caso la barrera de energía estará dada por la viscosidad del medio en que se encuentre la partícula. El tiempo propio de esta relajación puede expresarse según

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{K_B T} \quad (1.3)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $V_H$  es el volumen hidrodinámico de la partícula, correspondiente al volumen de la partícula más el del líquido que arrastre por viscosidad en su movimiento, y  $K_B T$  es la energía térmica.

Por otro lado, existe el mecanismo de relajación de Neel, en el que la magnetización rota internamente sin cambiar la posición de la partícula. En este caso, la barrera de energía viene dada por la anisotropía de la partícula y el tiempo de relajación se expresa como

$$\tau_N = \tau_0 \exp \frac{\Delta E}{k_B T} \quad (1.4)$$

siendo  $\tau_0$  una constante dependiente del material,  $\Delta E$  la barrera de energía dada por la anisotropía y  $k_B T$  -como ya se dijo- la energía térmica.[5]

Observar el superparamagnetismo no depende únicamente de la temperatura sino también del tiempo de medición u observación  $\tau_m$ . Si  $\tau_m \gg \tau$  las variaciones del momento de la nanopartícula ocurren en un tiempo menor al de medición y en el sistema se observa un comportamiento tipo paramagnético (PM), correspondiente a un *régimen superparamagnético*. Si, en cambio,  $\tau_m \ll \tau$  entonces el sistema no llegará a cambiar su magnetización y se observará como un sistema *bloqueado*.

En el régimen superparamagnético, el momento magnético tiene un comportamiento similar a un momento magnético clásico, por lo que es válido suponer que

$$M(H, T) = M_s \mathcal{L}\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) \quad (1.5)$$

siendo  $\mathcal{L}$  la forma funcional de *Langevin*

$$\mathcal{L}(x) = \cotg(x) - 1/x \quad (1.6)$$

que corresponde al límite de la función de Brillouin en el que  $J$  tiende a infinito y  $\hbar$  tiende a cero.

Para utilizar clínicamente las nanopartículas, existen ciertos requisitos. Entre ellos es sumamente importante que las partículas a utilizar sean superparamagnéticas a temperatura corporal (37 °C). Los momentos magnéticos de los monodominios superparamagnéticos cambian aleatoriamente el sentido de su magnetización, teniendo una interacción dipolar promedio nula entre ellos y así evitando la aglomeración de las partículas en suspensión. De este modo, en el caso de ser inyectadas en nuestro organismo, no se formarían trombos impidiendo la circulación sanguínea y se evitaría la formación de coágulos. Sin embargo, el comportamiento de las partículas a frecuencias de centenas de  $kHz$ , propios de los experimentos de hipertermia, presenta un ciclo de histéresis que será el que permita el calentamiento.

### 1.1.2. Hipertermia

La posibilidad de tratar el cáncer por medio de la hipertermia inducida artificialmente lleva al desarrollo de diferentes dispositivos diseñados para quemar las células malignas evitando el tejido sano.

El procedimiento de hipertermia por fluido magnético consiste en fijar partículas magnéticas en el tejido objetivo, y una vez localizadas aplicar un campo magnético AC de algunos cientos de *Gauss* y frecuencia del orden de los cientos de  $kHz$  para que las

partículas se calienten. Este calor se transmite al tejido circundante, elevándolo por sobre una temperatura de  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos o más, de modo de provocar la muerte celular y, así, el tumor quedaría destruido.

La mayoría de los dispositivos creados se restringen en su uso por el daño que provocan al tejido sano, mientras que la hipertermia mediante nanopartículas magnéticas presenta el beneficio de poder localizarse. El desafío se encuentra en poder entender los parámetros involucrados en este mecanismo para generar el calor suficiente en el tejido objetivo utilizando un campo magnético AC que cumpla los objetivos sobre el tratamiento planteado (muerte celular de las células cancerosas).

## 1.2. Plan de acción

El trabajo se separa en 3 secciones principales. En el Capítulo 3 se presenta el estudio y ajuste del modelo celular utilizado: las levaduras *saccharomyces cerevisiae*. La etapa de síntesis, funcionalización y caracterización de las partículas magnéticas se presenta en el Capítulo 5. La última etapa del trabajo consiste en la unión de las dos primeras, aplicando el campo magnético a las partículas dentro de los cultivos celulares. Para llegar a esta etapa del trabajo, se realizó una prueba de concepto que justificara el proyecto. Por lo tanto, se presentan la prueba de concepto en el Capítulo 4 y el estudio de hipertermia en cultivos celulares en el Capítulo 6. Por último, en el Capítulo 7 se presentan las conclusiones de este trabajo.

# Capítulo 2

## Nanopartículas magnéticas

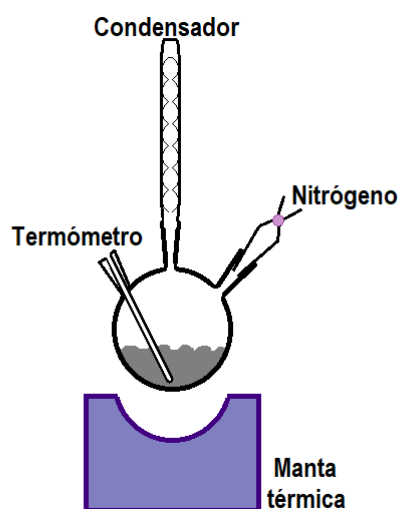
*“It’s so easy when you know the lyrics.”*

— Ella Fitzgerald.

### 2.1. Síntesis

Las partículas se sintetizan por una reacción química de descomposición a alta temperatura de precursores orgánicos en presencia de ácido oleico y oleilamina como surfactantes. Esta síntesis da como resultado la obtención de nanopartículas recubiertas de ácido oleico de tamaño definido con una distribución angosta de tamaño.

Para la síntesis de nanopartículas se utiliza un balón de tres bocas. En una de ellas se colocará un termómetro, en otra una válvula por la que ingresar un flujo controlado de Nitrógeno para generar una atmósfera inerte. En la última boca disponible se colocará en el momento adecuado un condensador. Se representa un esquema en la Fig. [2.1](#).



**Figura 2.1:** Esquema del dispositivo utilizado para realizar las síntesis de nanopartículas.

Se utiliza octadeceno para la dilución de los precursores y surfactantes como medio apolar. El ácido oleico y la oleilamina forman en él pequeñas micelas exponiendo sus colas no polares al solvente y uniendo sus cabezas polares a los Fe disponibles. De esta manera, las micelas funcionan como pequeños reactores donde ocurrirá la reacción de los precursores que da lugar a las partículas. Por esto, al finalizar la síntesis, éstas quedarán recubiertas por ácido oleico.

Además, se deben controlar las rampas de temperatura, ya que de la velocidad de cambio en la temperatura determinará el tamaño de las partículas. A rampas más rápidas, partículas de mayor tamaño, ya que altas velocidades de calentamiento las partículas más pequeñas no logran la estabilidad y coalescen en partículas mayores. Otros factores que influyen sobre el tamaño de las partículas sintetizadas es la proporción de precursor y surfactantes, y la temperatura final que alcance el sistema.

En todas las síntesis realizadas, se utiliza Acetil Acetonato de Hierro,  $Fe(acac)_3$ , como precursor. Éste cede el metal y el oxígeno al descomponerse, a una temperatura de aproximadamente  $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En este proceso, juegan un rol importante la oleilamina, como agente reductor del Hierro, el ácido oleico, que facilita el proceso de nucleación, y el octanediol, que interviene homogeneizando la reacción y angostando la franja de temperatura en la que se descompone el  $Fe(acac)_3$ .

## 2.2. Limpieza

Las partículas sintetizadas con el método recién descrito se encuentran recubiertas por ácido oleico. Para limpiarlas de este recubrimiento, se colocan en etanol, se resuspenden las partículas por medio de ultrasonido y se deja actuar durante una hora. Luego, se separan magnéticamente las partículas y se desecha el etanol. Se coloca metanol y nuevamente se utiliza una lavadora ultrasónica para resuspender las partículas. Las mismas quedarán en metanol durante toda la noche; durante este tiempo, el metanol reacciona con el ácido oleico removiéndolo de la superficie de las partículas. Por último, se retira el metanol y se coloca acetona. Se deja en ultrasonido a 40 °C durante una hora y media, y luego se lleva a un horno a la misma temperatura. Allí permanecerá durante 48 horas para que la acetona termine de limpiar la superficie de las partículas.

## 2.3. Funcionalización

El proceso de funcionalización de las nanopartículas consiste en realizarles un recubrimiento biocompatible para luego ser administradas al cultivo de levaduras. Se utilizaron dextrosa y glucosa como recubrimientos.

Se prepara una solución de agua desionizada *millipore* con hidróxido de amonio, de pH 12; se incorporan el azúcar a utilizar y las partículas desnudas. Se homogeneiza con ultrasonido y se cubre con parafilm para evitar su evaporación.

Transcurridas 48 horas, se separan magnéticamente las partículas y se desecha esta solución. Se enjuaga 3 veces con agua millipor para evitar restos de la solución anterior, que oxidaría las partículas.

Las partículas se conservan a  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  en un freezer para evitar tanto la oxidación como la contaminación biológica.

## 2.4. Caracterización

### 2.4.1. Fast Fourier Infrared Spectroscopy (FTIR)

Mediante un equipo PerkinElmer UATR Two, se observan las líneas de absorción del espectro infrarrojo de las nanopartículas. Con esta técnica se determina la presencia de las distintas moléculas en la superficie de las mismas.

Se utiliza una gota de la suspensión preparada, secada con gas de  $N_2$ , sobre la cual se incide con un rayo de luz infrarroja. Se registra el espectro dado por la reflexión del haz. En el caso de muestras sólidas, se aplica una presión sobre el polvo que garantice su contacto con la superficie de incidencia del haz.

### 2.4.2. Dynamic Light Scattering (DLS)

Este método sirve para obtener la distribución de tamaño de las partículas. Se basa en la dispersión de la luz por parte de las partículas en suspensión al incidir un haz sobre la misma. Esta dispersión es dependiente de la distribución de tamaños de las partículas. El equipo utilizado, modelo *Nano ZS90* de *ZetaSizer - Nano series*, posee en su software un modelo basado en partículas esféricas con el cual calcula la distribución de tamaños entregada.

Se preparan los portamuestras de sección cuadrada con suspensiones muy diluídas de las nanopartículas a medir. Para garantizar la efectividad del método, las suspensiones deben ser transparentes. Los portamuestras utilizados fueron de plástico para las suspensiones cuyo solvente fuera agua y de vidrio para el caso de solvente orgánico.

### 2.4.3. Termogravimetría (TGA)

Este estudio permite determinar la composición de la muestra según sus procesos de evaporación, descomposición y oxidación al ser sometidas a temperatura. Con este análisis se busca determinar el porcentaje de masa orgánica en las partículas utilizadas. La Termogravimetría se basa en la medida de la variación de la masa de una muestra al someterse dicha muestra a un programa de temperatura. Se trabaja en una atmósfera controlada con un flujo constante de Argón, utilizando una masa similar de muestra que de alúmina como blanco. Se disponen ambos materiales en los platos de una balanza diferencial de alta precisión del equipo utilizado, modelo *DTG-60H* de *Shimadzu*.

### 2.4.4. Caracterización magnética

La caracterización magnética permite comprobar el comportamiento superparamagnético de las partículas con que se trabaja mediante una curva de magnetización en función del campo aplicado, y da información sobre transiciones de fase y temperatura de bloqueo mediante la medición de la curva de magnetización en función de la temperatura.

Se coloca cierta cantidad de nanopartículas en suspensión, cuya concentración es conocida. Se mezcla con polímero *Polyvinylpyrrolidone* (PVP) y se deja secar; de esta manera las partículas quedan fijas, dispersas, minimizando las interacciones entre las mismas y evitando el mecanismo de relajación de Brown. Luego, este sólido se muele para ser colocado dentro de una cápsula de gelatina. Se completa el volumen de la cápsula con papel tisue de susceptibilidad conocida para ser descontado de las mediciones; de esta manera las partículas en la muestra se fijan. El método de medición mueve la muestra dentro de las bobinas detectoras; si se movieran las partículas de la muestra dentro del portamuestras los datos no tendrían validez.

### Vibrating Sample Magnetometer (VSM)

El equipo utilizado es un *LakeShore*. En él se introduce la muestra entre las piezas polares del imán y el centro entre las bobinas detectoras. Se utilizó una secuencia para variar el campo el campo de 10000  $G$  a  $-10000 G$ , midiendo la magnetización de la muestra cada 100  $G$  y manteniendo la temperatura constante al valor que se fijara.

Otra secuencia utilizada mantenía el campo magnético a un valor fijo y variaba la temperatura.

### Superconducting Quantum Interference Device (SQUID)

Este equipo, *Quantum Design MPMS-5S*, permite mediciones más precisas que el anterior mediante un funcionamiento similar. En el caso del SQUID, la muestra magnetizada induce una *fem* en un sistema de bobinas, pero el detector se vale de una *juntura Josephson* que detecta los cuantos de flujo magnetico con una gran sensibilidad.

#### 2.4.5. Hipertermia

Para ensayos de hipertermia magnética se utilizó un equipo *NanoScale Biomagnetics*, configurado en un campo magnético AC de 570  $kHz$  y 200 *Gauss* de amplitud. Se utilizaron programas de diferentes tiempos, pero sin cambiar las magnitudes anteriores.



## 2.5. Partículas utilizadas

A lo largo de este proyecto se sintetizaron diferentes tipos de partículas:

Las primeras fueron sintetizadas por Enio Lima Jr. que fueron utilizadas para la *Prueba de concepto*, cuyos resultados se presentan en el Cap. 4.

Luego, se sintetizaron partículas de óxidos de hierro y de óxido de hierro dopado con zinc. Estas partículas se utilizaron para probar el calentamiento por hipertermia magnética (Ver Cap. 5) para luego llegar a probar el mismo fenómeno dentro de un cultivo celular (Ver Cap.6).

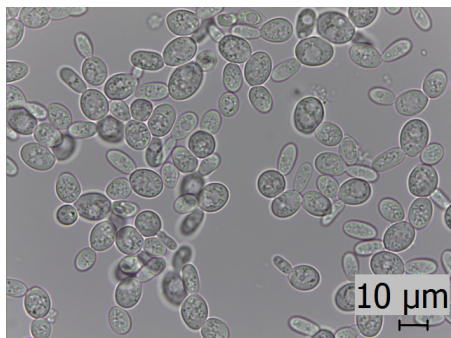
# Capítulo 3

## Modelo celular

*“The phoenix must burn to emerge.”*

— Janet Fitch.

Las levaduras *saccharomyces cerevisiae* son organismos unicelulares de entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , eucariotas y pertenecen al reino funghi. Se muestra una imagen tomada con microscopio óptico a 100x en la Fig. 3.1.



**Figura 3.1:** Cultivo de levaduras *saccharomyces cerevisiae*. En el interior de cada una de ella pueden verse organelas y un gran núcleo.

Estos cultivos presentan un crecimiento rápido y facilidad para replicarse. Los tiempos para realizar este proyecto son acotados y las levaduras se reproducen en cuestión de algunas horas.

Por estos motivos, su no toxicidad y su fácil manipulación dentro de los parámetros de bioseguridad I, éste resulta un modelo muy utilizado para estudios biológicos, dando un punto de partida para el estudio y análisis de organismos eucariotas más complejos como pueden ser las células humanas. Por lo mismo, decidimos adoptarlo como modelo

para los ensayos in-vitro a realizar en nuestro estudio del proceso de hipertermia.

### 3.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) presenta las condiciones óptimas para el crecimiento de la levadura. Se preparó colocando 1 g de extracto de levadura, 2 g de tripteína bacteriológica y 2 g de glucosa en 100 ml de agua destilada, según lo indicado en el protocolo [6]. Luego se preparó otro similar, agregando además 2 g de agar para lograr un medio de cultivo sólido. Se autoclavaron los medios ingresándolos en un recipiente de autoclave donde se configuró la presión en 1,21 atm, llegando a hervor a aproximadamente 107 °C. Alcanzadas estas condiciones, se mantienen durante 20 minutos para garantizar la esterilidad.

Una vez esteril, se midió la *Densidad Óptica* del medio de cultivo. La *Densidad Óptica* (OD, por sus siglas en inglés) corresponde a la magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia, para una longitud de onda dada. A lo largo de este trabajo, la longitud de onda utilizada fue de 600 nm.

El valor de densidad óptica del medio de cultivo YPD líquido es de 0,125 Abs.

### 3.2. Selección de la línea celular

Se prepararon dos placas de petri con medio de cultivo con agar, trabajando en esterilidad bajo una campana de bioseguridad I. Esta campana posee un flujo laminar hacia afuera, protegiendo a la muestra de la contaminación externa, pero no protege al usuario, por lo que no debe utilizarse para preparados tóxicos o patológicos. Dentro de la campana se trabaja únicamente con instrumentos estériles, se debe limpiar la superficie con una solución de alcohol al 70 % en agua antes de trabajar, y luego tener el recaudo de limpiar con el mismo alcohol cada elemento a ingresar. Mantener estas condiciones garantiza que el cultivo se mantenga axénico. Al retirarse de la campana, se vuelve a limpiar la superficie, dejando así la campana lista para el próximo usuario.

Se tomó una pequeña porción de un cubito de levadura prensada fresca, fue diluída en agua generando una solución muy saturada. Se la mezcló mediante el uso de un vortex y se estrió con un anza la solución de levadura en las placas de petri con el medio de cultivo sólido.

Se dejaron crecer toda la noche (Over Night - *ON*) a 37 °C. Al día siguiente se seleccionó una de las colonias formadas para iniciar el *cultivo patrón* con el que se realizarán todos los experimentos de este trabajo.

La Fig. 3.2 muestra la placa de petri con el medio YPD con agregado de agar en el cual crecieron las levaduras del preparado estriado. Señalado con un círculo negro, se observa el lugar en que se encontraba la colonia seleccionada para generar el cultivo patrón.



**Figura 3.2:** Se muestra una fotografía del estriado realizado sobre YPD con agregado de agar. Se observa un círculo señalando la posición de la colonia retirada para empezar el cultivo patrón.

Se colocó la colonia seleccionada en 10 *ml* del medio de cultivo líquido y se llevó a incubar en un agitador orbital con temperatura controlada a 37 °C, a 200 *RPM*, *ON*. El movimiento orbital permite que la solución se oxigene y favorece el crecimiento de la colonia.

Al día siguiente se encontró que el cultivo había adquirido una apariencia lechosa. Se colocó entonces parte del mismo en un criovial con glicerol, quedando una solución al 50 % y se conservó la muestra congelándola en un termo con nitrógeno líquido.

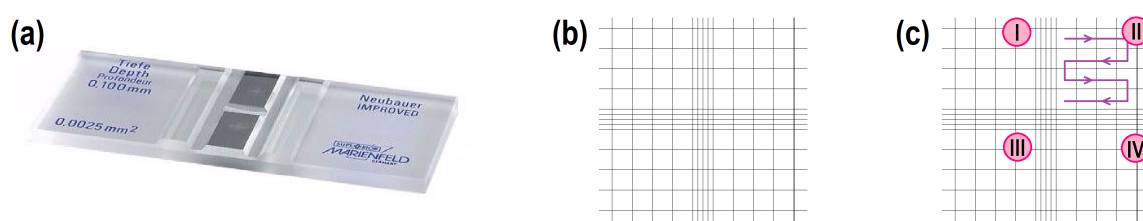
Al día siguiente, se colocaron 20 *ml* de YPD en un erlenmeyer y, se agregó una pequeña porción del preparado congelado, raspando su superficie con un anza. Se colocó en el agitador orbital a 37 °C, 200 *RPM*, *ON*. Mediante esta incubación se comprobó el crecimiento de las levaduras, validando la calidad de la muestra patrón.

Ésta será la línea celular a utilizar en los experimentos posteriores.

### 3.3. Cámara de NeuBauer

La *cámara de NeuBauer* consiste en un portaobjetos grabado con dos *gradillas* localizadas entre canaletas como se muestra en la Fig. 3.3 (a).

Cada gradilla posee cuatro cuadrantes mayores, divididos en 16 sectores iguales cada uno, y 4 cuadrantes menores similares que serán utilizados en caso de organismos más pequeños. Se muestra un esquema de estas gradillas en la Fig. 3.3 (b)



**Figura 3.3:** (a) Cámara de NeuBauer utilizada. Las zonas coloreadas son aquellas en que se encuentran grabadas las gradillas en las que se realizan los conteos celulares. (b) Esquema de la gradilla grabada en las zonas señaladas. (c) Esquema de un cuadrante de la gradilla indicando el orden en que se realiza el conteo.

El conteo celular consiste en registrar la cantidad de células observadas por cuadrante, contando en el sentido que se esquematiza en la Fig. 3.3 (c). Para garantizar la validez del método se precisa un mínimo de 4 células por cuadrante.

La densidad celular del cultivo  $\delta$  resulta entonces

$$\delta \left[ \frac{\bar{c}}{ml} \right] = \bar{X} f_d \times 10^4, \quad (3.1)$$

siendo  $\bar{c}$  la cantidad media de células,  $\bar{X}$  el promedio de la cantidad de células contadas por cuadrante, y  $f_d$  el factor de dilución.

## 3.4. Protocolo de descongelado y siembra del cultivo celular

Se colocan 30 *ml* de medio de cultivo *YPD* en un *erlenmeyer* de 250 *ml*. En él se coloca una porción del cultivo congelado en glicerol, raspando el mismo con un anza (sin descongelar). Se dispone el cultivo en un agitador orbital a 37 °C, 200 *RPM*, *ON*.

Al día siguiente, utilizando una cámara de NeuBauer se realiza un conteo celular de este inóculo para sembrar  $10^4$  *celulas/ml* por duplicado en 20 *ml* de cultivo utilizando *erlenmeyers* de 50 *ml* de capacidad. Se dispone nuevamente el cultivo a 37 °C, 200 *RPM*.

## 3.5. Ajuste del modelo celular

### 3.5.1. Curva de crecimiento

#### Método

Se siguió el protocolo de descongelado y siembra del cultivo celular.

Durante 27 horas, se registró periódicamente el OD del ambos cultivos. Se realizaron las diluciones necesarias para que los valores medidos fueran menores a 1, ya que así se asegura encontrarse bajo las condiciones de la ley Lambert-Beer.

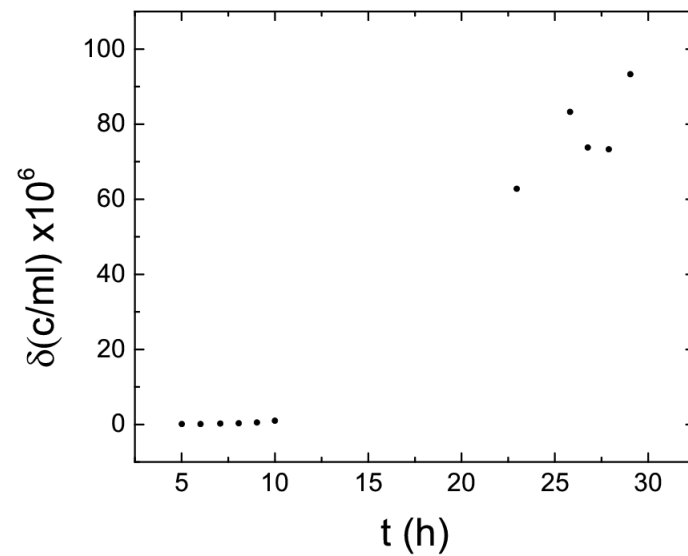
Para cada tiempo, se realizó también un conteo celular en una cámara de NeuBauer.

#### Resultados

En esta sección se presentan los valores promedio de ambos cultivos, ya que su comportamiento presentó una diferencia menor al 10 %.

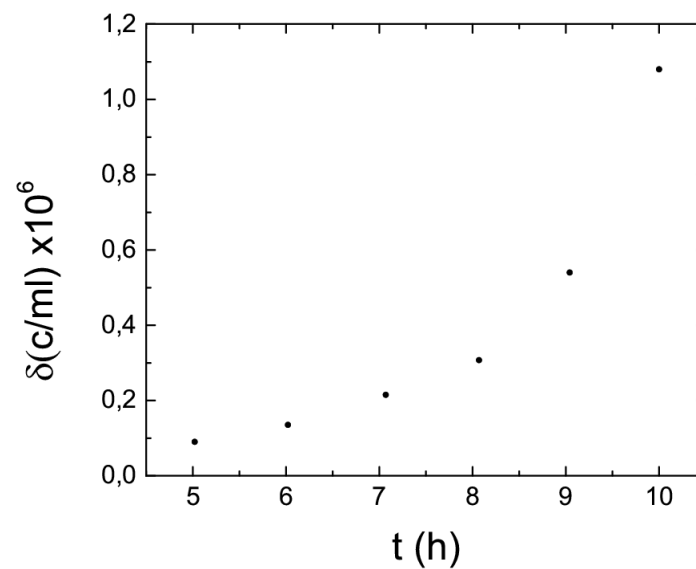
Durante las primeras 4 horas no pudo realizarse el conteo celular ya que la cantidad de células por cuadrante era menor o igual a 4, y el método requiere un mínimo de 4 células por cuadrante para que el valor tenga sentido dentro del error. Los resultados

se presentan en la Fig. 3.4.



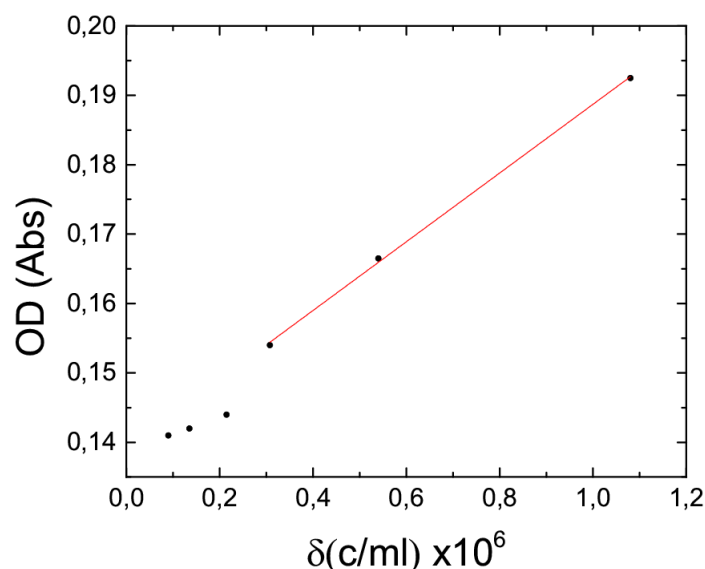
**Figura 3.4:** Promedio de las mediciones realizadas sobre ambos cultivos. Se presenta la densidad celular según el conteo en cámara de NeuBauer en función del tiempo.

Se presenta en detalle el crecimiento durante las primeras 10 horas en la Fig. 3.5. Durante las primeras 7 *hs* se observa una fase *lag* de crecimiento, en el que la densidad celular aumenta muy poco en el tiempo. Luego, el crecimiento se vuelve exponencial. Por último se registró un crecimiento notablemente menor, llegando a una fase *estacionaria*.



**Figura 3.5:** Mediciones correspondientes a las primeras 10 horas. En este caso se observa claramente el crecimiento exponencial.

Por otro lado, en la Fig. 3.6 se grafican los valores de  $OD$  en función de la densidad celular promedio.



**Figura 3.6:** OD en función de la densidad celular del cultivo. Se presenta el ajuste correspondiente a la fase exponencial de crecimiento.

Se pueden observar dos relaciones lineales entre los valores. Los primeros valores, cuyo ajuste presenta una pendiente menor, corresponden a la *fase lag* de crecimiento, mientras que los siguientes son el principio de la *fase exponencial*. Esta será la etapa de crecimiento de interés, ya que -recordando la motivación de este trabajo- las células objetivo para el tratamiento por hipertermia magnética estarán en esta fase.

Considerando los valores dados por el ajuste en la fase de crecimiento exponencial, la ecuación que los relaciona es

$$\delta \left[ \frac{\bar{c}}{ml} \right] = \frac{(OD[Abs] - 0,14) \times 10^8}{4,95} \quad (3.2)$$

### 3.5.2. Protocolo de viabilidad

#### Azul de Metileno

El *azul de metileno* es un colorante orgánico. Cuando las células están inmersas en una solución con azul de metileno, éste penetra ellas. Aquellas que se encuentren metabólicamente activas, lo reducen y decoloran, manteniéndose claras y refringentes



en su estado normal. En cambio, las células *equidecentes* no realizan este proceso y quedan teñidas de azul. De esta manera, pueden distinguirse las células vivas de las células muertas.

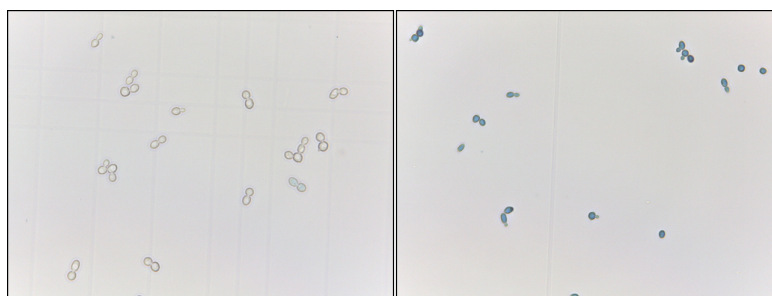
Debe tenerse el recaudo de ajustar el protocolo para estudiar viabilidad sin afectar al sistema, ya que el colorante resulta tóxico a grandes concentraciones o largas exposiciones, y debe encontrarse en una concentración suficiente para alcanzar a todas las células.

### Ajuste del protocolo

Se realizó el protocolo de descongelado. Esta vez, no se sembró el cultivo por duplicado sino que se realizó el conteo celular y se dispusieron 4 *eppendorfs* con 1 *ml* de cultivo cuya densidad celular fuera de  $10^6 \text{ c}/\text{ml}$ . Dos de ellos se colocaron en un bloque térmico a  $100^\circ\text{C}$  durante 10 minutos: éstos serán los *controles positivos* de muerte celular.

A continuación, se probaron distintas concentraciones de *azul de metileno* tanto en los cultivos vivos como en los controles positivos para ajustar el protocolo de viabilidad.

El protocolo efectivo para comprobar viabilidad resultó de centrifugar 0,5 *ml* de cultivo a 500 *RPM* durante 5 *minutos*. Se pipeteó el sobrenadante y luego se agregó 1 *ml* de solución de azul de metileno al 1 % al *pellet* resultante del proceso de centrifugado. Se agitó para resuspender las células y se dejó actuar durante un minuto. Se observó en el microscopio; las células vivas no presentaron cambios, mientras que las células *equidecentes* se tiñeron de azul. Se presentan imágenes tomadas en la Fig. 3.7



**Figura 3.7:** A la izquierda se observan células de *saccharomyces cerevisiae* vivas en azul de metileno al 1 %. Se observan refringentes, claras y con su forma y tamaño habitual. A la derecha, se presenta el mismo tipo de células, esta vez *equidecentes*, bajo las mismas condiciones. En este caso se observa que las células se encuentran teñidas por el colorante. Además, la pared celular resulta oscurecida y el tamaño promedio es ligeramente menor. Por todo esto, se considera que estas células no se encuentran metabólicamente activas.

# Capítulo 4

## Prueba de concepto

*“I’d rather be partly great than entirely useless.”*

— Neal Shusterman.

Para la prueba de concepto realizada en este trabajo, se utilizaron partículas de magnetita de un stock sintetizado por el Dr. Enio Lima Jr.

La magnetita es un mineral de hierro constituido por óxido ferroso-diférrico ( $Fe_3O_4$ ). Presenta un comportamiento ferrimagnético, ya que los momentos magnéticos de los distintos cationes del sistema ( $Fe^{2+}Fe_2^{3+}O_4^{-2}$ ) se encuentran fuertemente acoplados de forma que en cada celda unidad resulta un momento magnético no compensado. La suma de estos momentos magnéticos es la responsable de que la magnetita tenga un momento magnético elevado. Es el óxido de hierro con mayor magnetización presente en la naturaleza.

En la estructura cristalina de la magnetita, los oxígenos forman una red FCC y los iones de hierro ocupan espacios intersticiales. La mitad de los  $Fe^{3+}$  ocupan sitios tetraédricos, mientras la otra mitad ocupa sitios octaédricos, al igual que los  $Fe^{2+}$ . La celda unidad está compuesta por 32 iones  $O^{2-}$  y su parámetro de red es  $a = 0,839 \text{ nm}$ .

A bajas temperaturas, la magnetita atraviesa una transición de fase cristalina conocida como *Transición de Verwey*, de una estructura monoclinica (rectangular) a una cúbica. Esta transición ocurre a temperaturas cercanas a los 121 K, dependiendo de las características inherentes al proceso de síntesis [7].

Se realizó un recubrimiento con dextrosa. Éste es un polisacárido de glucosa con enlaces ( $\alpha 1 \rightarrow 6$ ) y ramificaciones ( $\alpha 1 \rightarrow 4$ ), ( $\alpha 1 \rightarrow 2$ ) y ( $\alpha 1 \rightarrow 3$ ).

Utilizando una micropipeta se colocaron 9,5 *ml* de la preparación de YPD con levaduras en dos erlenmeyer de 50 *ml* y se agregó a uno de ellos 200  $\mu$ *l* de la suspensión de nanopartículas, y al otro 200  $\mu$ *l* del mismo agua que usamos para la suspensión (agua desionizada milipor). Luego, los preparados se dispusieron para su incubación en el agitador orbital a 200 *RPM* y a 37 °C, *ON*.

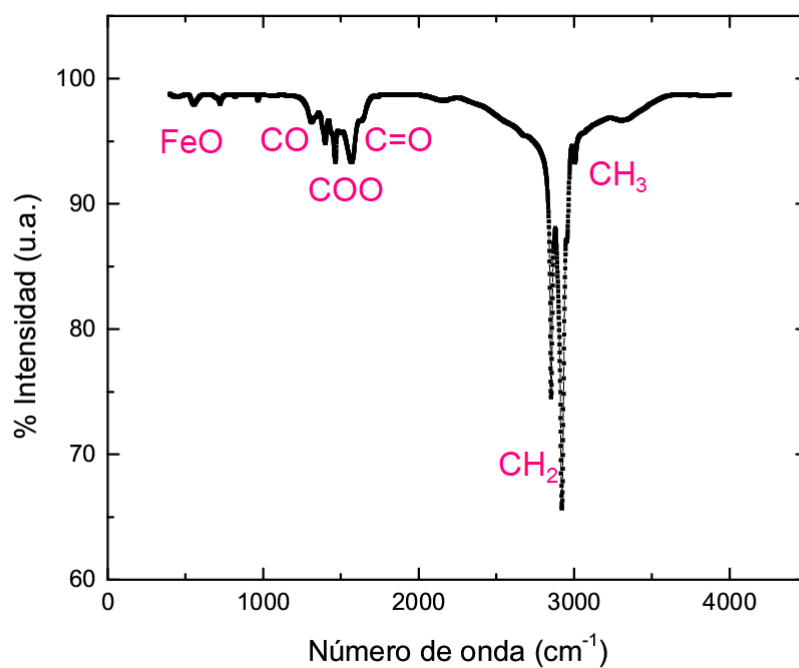
Al día siguiente se observaron notablemente opacadas las dos soluciones. La solución con nanopartículas se notaba de un color más oscuro que la otra. Se midió la OD y se obtuvieron valores similares entre sí y mucho mayores a los anteriores. Se colocaron en la heladera (4 a 8 °C) para detener el crecimiento de los cultivos y posibilitar su uso posterior.

Se observaron ambas muestras en un microscopio, colocando 36  $\mu$ *l* de cada una sobre un portaobjetos y cubriendo cuidadosamente con un cubreobjetos. Durante la medición debió controlarse que la muestra se mantuviera hidratada.

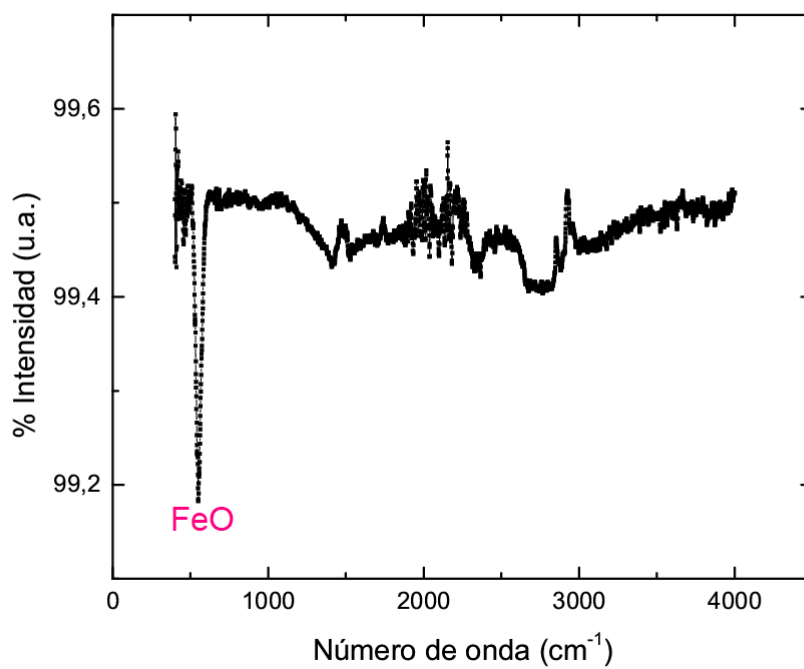
Se centrifugaron las muestras para separar las levaduras del medio en un caso y del medio y partículas sueltas en el otro. Se colocaron en el secador a 45 °C para secarlas y medir su magnetización a *RT* (Room Temperature) en VSM.

## 4.1. Funcionalización

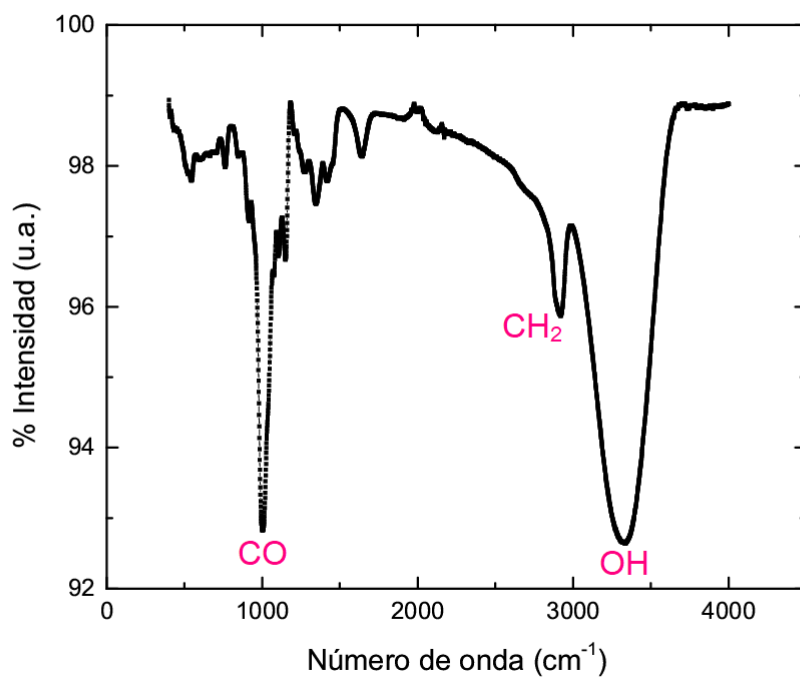
En la Fig 4.1 se muestra el espectro FTIR inicial de las partículas con ácido oleico. Luego de la reacción con acetona, se muestran las partículas desnudas en la Fig. 4.2. A continuación se presentan el dextrán antes y después de colocarlo en solución acuosa de amoníaco con pH 12 en las Fig. 4.3 y 4.4 respectivamente. Por último, se observa el resultado de la funcionalización en la Fig. 4.5. Puede observarse claramente como en este proceso desaparece el pico correspondiente al ácido oleico y luego se agrega el del dextrán. De esta forma queda establecido que el proceso de funcionalización de las nanopartículas de magnetita resulta exitoso, dejando una capa superficial formada por moléculas de dextrán.



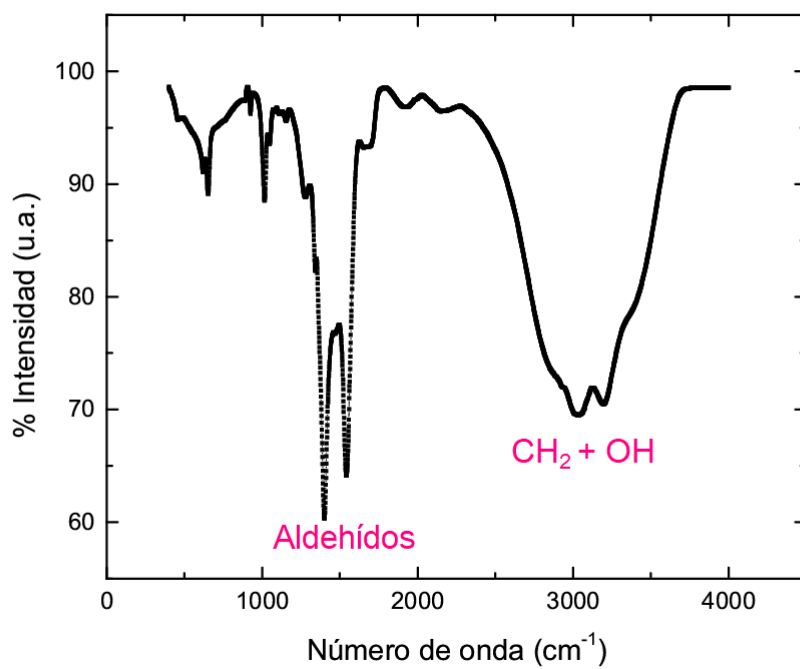
**Figura 4.1:** Espectro FTIR de partículas de  $Fe_3O_4$  con recubrimiento de ácido oleico.



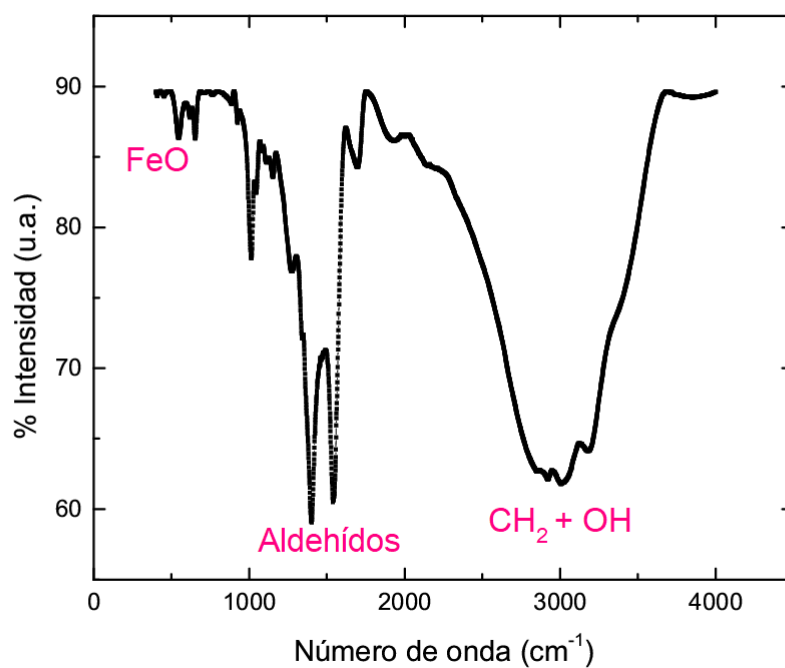
**Figura 4.2:** Espectro FTIR de partículas de  $Fe_3O_4$  desnudas



**Figura 4.3:** Espectro FTIR de dextrán antes de colocar en solución a pH 12



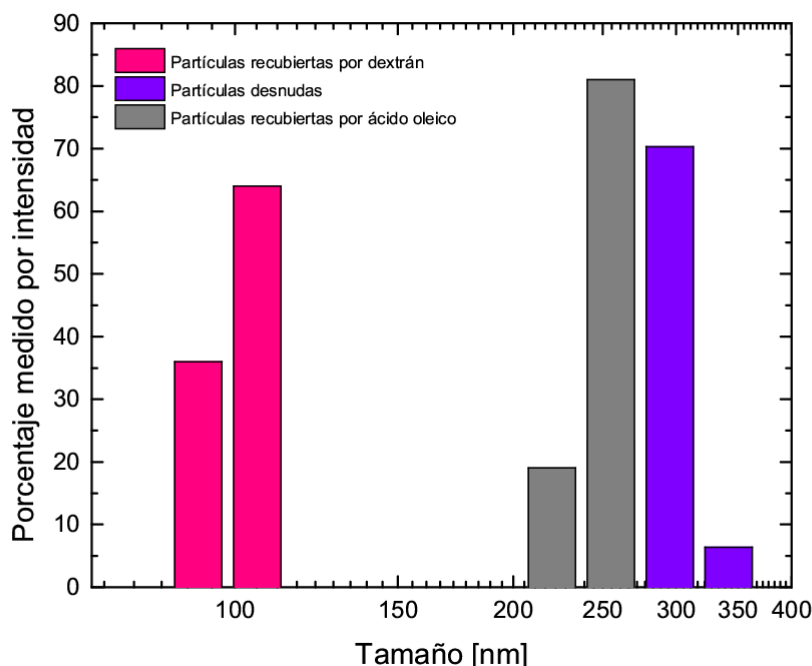
**Figura 4.4:** Espectro FTIR de dextrán luego de colocar en solución a pH 12



**Figura 4.5:** Espectro FTIR de partículas de  $Fe_3O_4$  luego de realizar el recubrimiento con dextrán.

#### 4.1.1. Distribución de tamaños

Se realizaron mediciones de dispersión de luz de suspensiones de nanopartículas recubiertas por ácido oleico, partículas desnudas y partículas recubiertas por dextrán. Los resultados se observan en la Fig. [4.6](#)



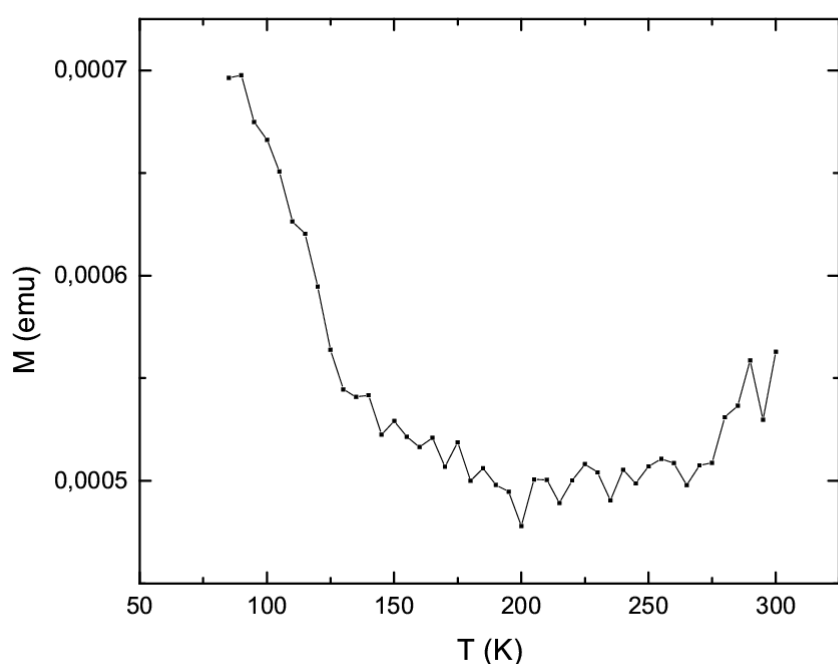
**Figura 4.6:** Mediciones de los diámetros realizadas por dispersión de luz (DLS). Se observan los diámetros medios de aglomerados de partículas recubiertas en dextrán (rosa), desnudas (violeta) y recubiertas en ácido oleico (gris)

De esta medición se observan los diámetros medios, obteniendo como resultados:  $248 \pm 20 \text{ nm}$  para las partículas recubiertas por ácido oleico,  $289 \pm 30 \text{ nm}$  para las partículas desnudas y  $100 \pm 8 \text{ nm}$  para las partículas recubiertas por dextrán.

Se observa un comportamiento anómalo, opuesto a lo esperado ya que las partículas desnudas resultan con un diámetro mayor a las que tienen una molécula extra en su superficie. Esto se justifica teniendo en cuenta las interacciones entre partículas. El recubrimiento de ácido oleico producto de la síntesis es un recubrimiento delgado, del orden de  $2 \text{ nm}$ , que permite la interacción entre partículas y la formación de aglomerados. Estas interacciones responden a la forma  $1/r$ . Al quitar el recubrimiento, los aglomerados medidos resultan ligeramente mayores siendo de aproximadamente 50 nanopartículas, suponiendo válido el diámetro medio nominal por partícula dado por el proceso de síntesis ( $23 \pm 2 \text{ nm}$ ). Por último, el diámetro medido para las partículas recubiertas por dextrán es el menor de todos. Esto indica que las interacciones se ven notablemente disminuidas por la capa de dextrán (de aproximadamente  $30 \text{ nm}$ ), resultando en cúmulos de 1 ó 2 nanopartículas aproximadamente.

### 4.1.2. Caracterización magnética

Se midió la magnetización de las partículas en función de la temperatura aplicando un campo magnético  $H = 200 \text{ Gauss}$ . La medición se presenta en la Fig. 4.7. Al aumentar la temperatura, se observa que la magnetización del sistema disminuye hasta alcanzar la temperatura de  $160 \text{ K}$ . Luego, se observa un cambio brusco en la curva, donde la magnetización deja de obedecer la ley de Curie, aumentando sus valores; esto es debido a la transición de Verwey, indicando la buena cristalización de la magnetita.



**Figura 4.7:** Magnetización en función de la temperatura para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán a campo fijo en  $200 \text{ Gauss}$ .

Al estudiar el comportamiento de la magnetización en función del campo aplicado para distintas temperaturas (Fig. 4.8 a Fig. 4.12), se observa un pequeño ciclo de histéresis, indicando que parte de la muestra de nanopartículas está en régimen bloqueado.

Se realizó un ajuste lineal de  $M$  en las zonas de alto campo que permitieron calcular la magnetización de saturación media  $M_s$ .

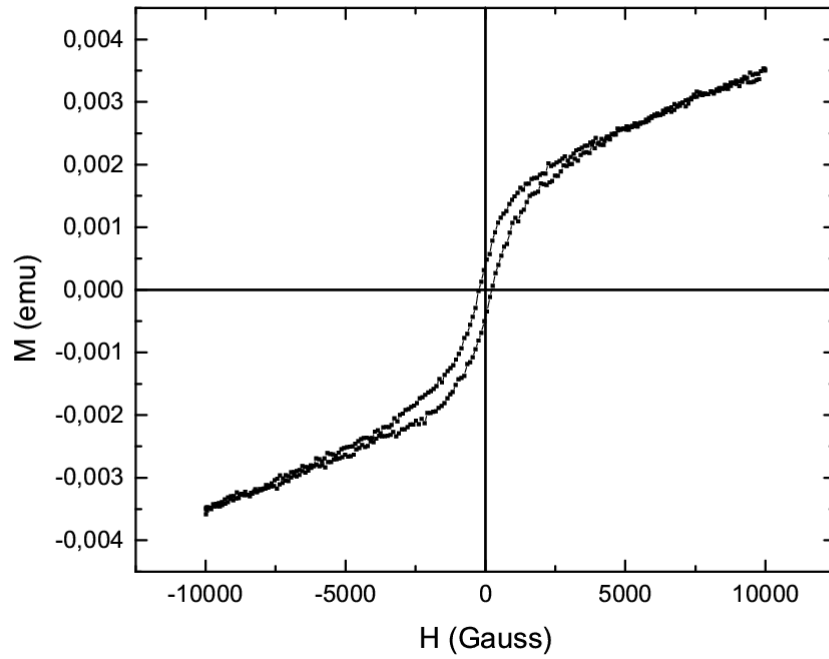
Si bien al presentar un pequeño ciclo de histéresis nos indica que algunas de las partículas se encuentran en régimen bloqueado, se realizó otro ajuste con la forma funcional de Langevin



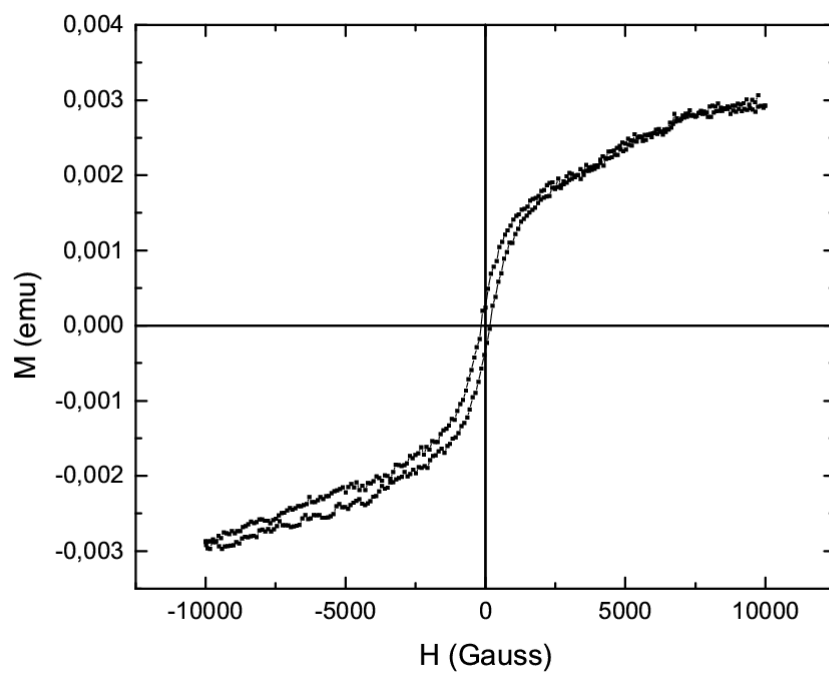
$$L(x) = c \tan(x) - \frac{1}{x} \quad (4.1)$$

con  $x = \frac{\mu M}{k_B T}$  para estimar el valor del momento de las partículas.

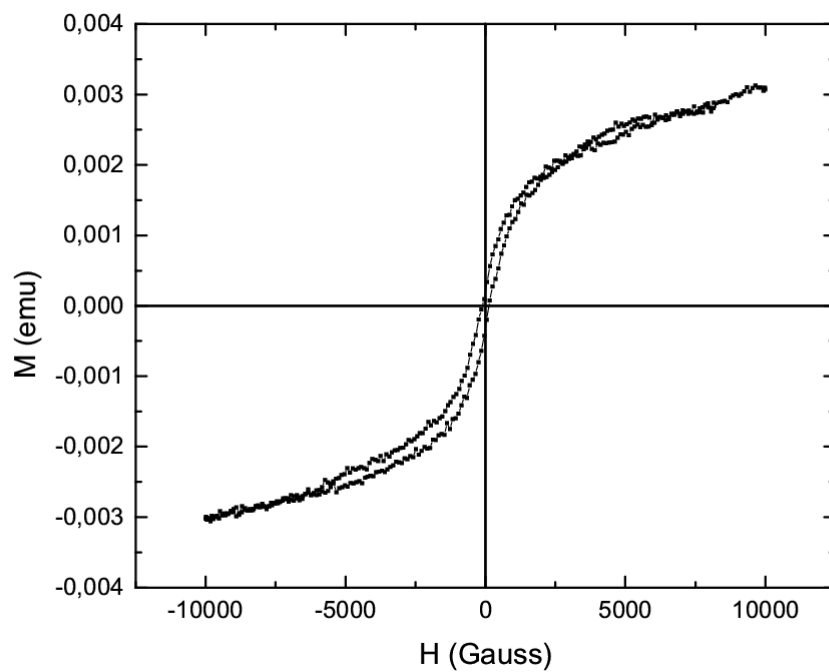
En la medición de  $M_s(H)$  se observa una variación entre los 100 y los 150  $K$ . Esto se corresponde con la transición de Verwey ya observado en el análisis de  $M(T)$ , que consiste en una variación de las fases, como se observa en la Fig. 4.13



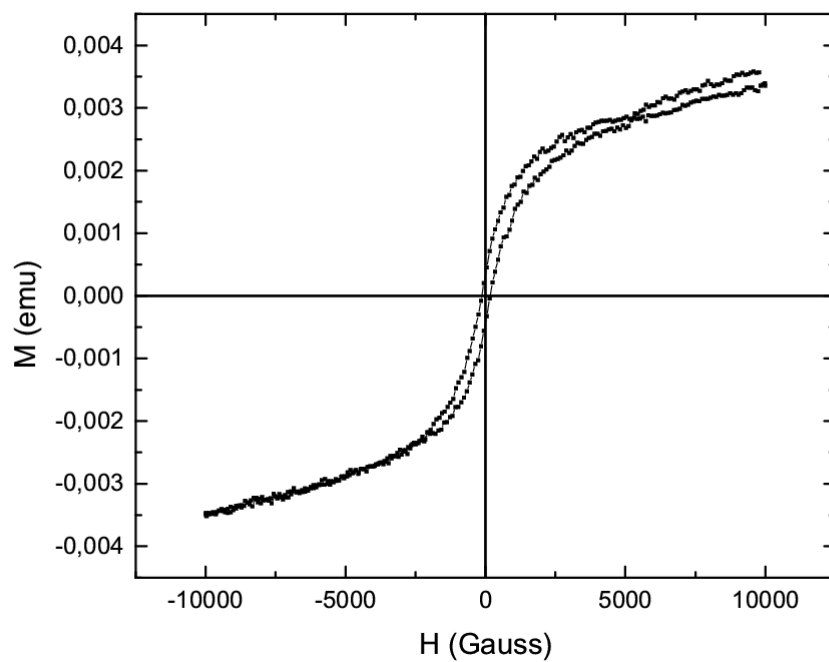
**Figura 4.8:** Magnetización en función del campo para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán medida a  $T = 100 K$ .



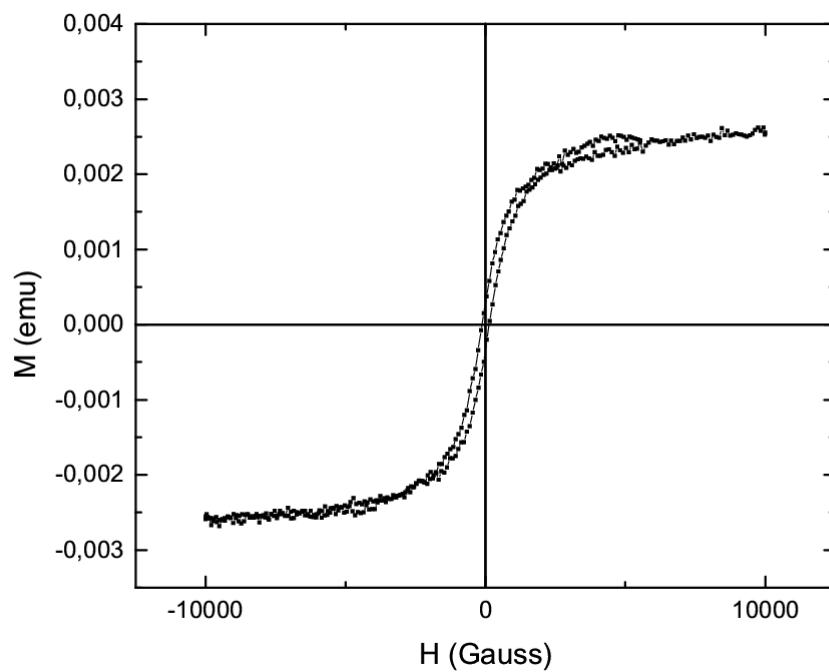
**Figura 4.9:** Magnetización en función del campo para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán medida a  $T = 150\text{ K}$ .



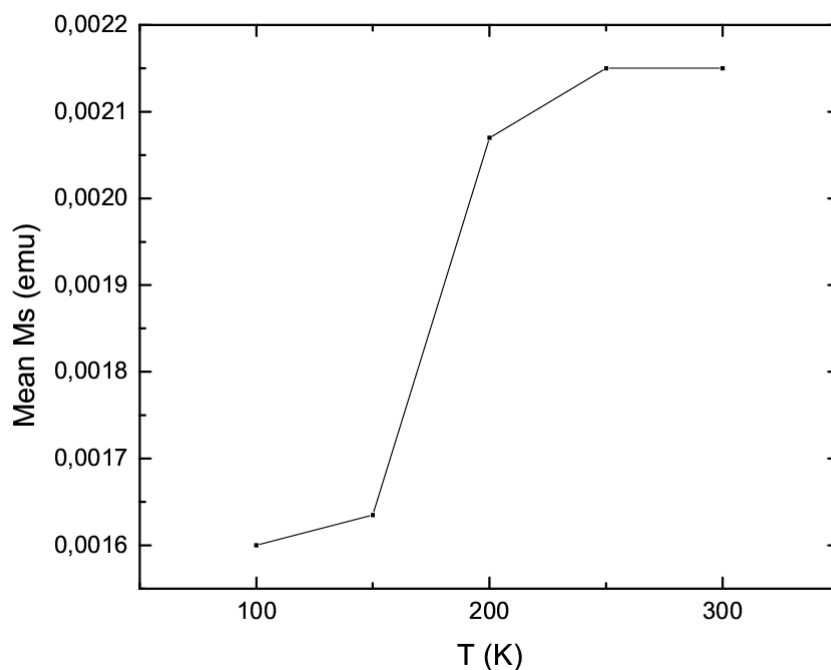
**Figura 4.10:** Magnetización en función del campo para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán medida a  $T = 200\text{ K}$ .



**Figura 4.11:** Magnetización en función del campo para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán medida a  $T = 250\text{ K}$ .



**Figura 4.12:** Magnetización en función del campo para  $Fe_3O_4$  recubierta por dextrán medida a  $T = 300\text{ K}$ .



**Figura 4.13:** Magnetización de saturación del sistema en función de la temperatura.

### 4.1.3. Purificación e incubación de las levaduras

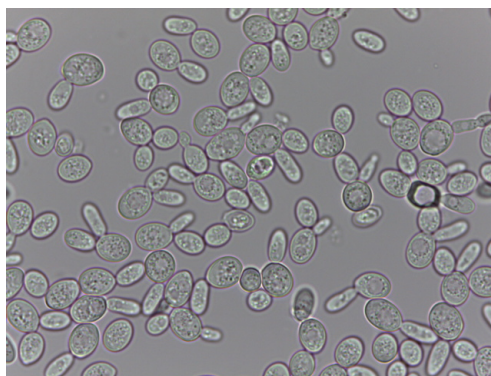
Se separó la muestra preparada en dos erlenmeyer más pequeños (50 ml) y se realizó la prueba de concepto, agregando con una micropipeta 200  $\mu\text{l}$  de suspensión 5% de nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas por dextrán a uno de ellos y la misma cantidad de agua des ionizada millipor al otro. Se colocaron en el agitador orbital a 200 RPM y 37 °C, ON. En la Fig. 4.14 se muestra el resultado obtenido al día siguiente. Puede observarse la solución notablemente más turbia que el medio limpio y además una diferencia en la coloración debido a las partículas.



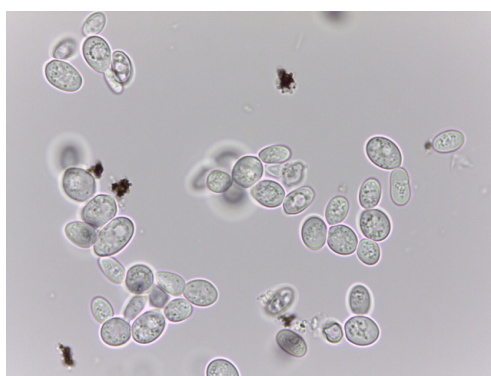
**Figura 4.14:** Se observa a la izquierda el cultivo de levaduras con agregado de nanopartículas y a la derecha el cultivo de control. Puede notarse un ligero cambio en la coloración

La medición de OD sobre estos cultivos resultó en 2,65 Abs para el cultivo sin partículas y 2,68 para aquel al que se le agregaron nanopartículas. Esto indica que las levaduras continuaron reproduciéndose correctamente y de manera similar independientemente del agregado de partículas, es decir, que éstas no resultaron tóxicas para las células.

Luego se observaron ambas muestras bajo el microscopio. Imágenes de lo observado se presentan en las Fig. 4.15 y 4.16. En la primera, se observan las levaduras con sus organelas, mientras que en el segundo se aprecian además cúmulos de partículas que no fueron incorporados por las levaduras. Se pudo observar movimiento de las células, indicando que las mismas estaban vivas, lo que verifica la viabilidad del método.

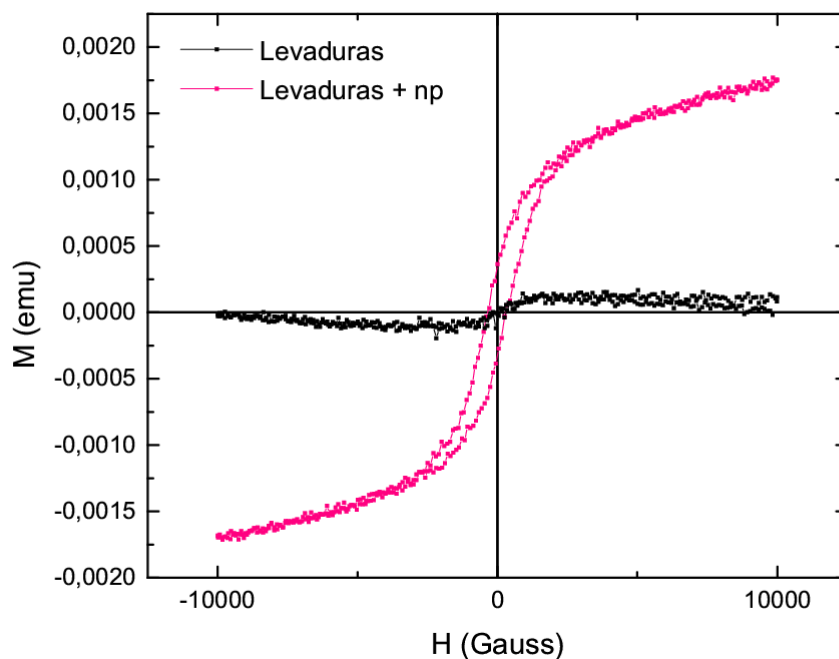


**Figura 4.15:** Cultivo de levadura sin agregado de nanopartículas bajo el aumento 100x



**Figura 4.16:** Se observa el cultivo de levadura con agregado de nanopartículas bajo el aumento 100x

El aumento utilizado no es suficiente para apreciar las nanopartículas individuales, por lo que se buscó estudiar la incorporación de las partículas separando las levaduras de ambas muestras y medirles su magnetización. El resultado de esta medición se presenta en la Fig. [4.17](#).



**Figura 4.17:** Medición en VSM realizada sobre levaduras del cultivo control (*negro*) y levaduras alimentadas con partículas de  $Fe_3O_4$  recubiertas en dextrán (*rosa*).

Las levaduras de control (sin nanopartículas) muestran una pequeña señal magnética de probable contaminación en la manipulación de la muestra. Mientras que la medición de las levaduras a las que fueron incorporadas las partículas muestra una magnetización apreciable y un ciclo de histéresis similar al medido al caracterizar las partículas. Esto verifica la incorporación de partículas en la levadura.

Además, de la Fig. 4.12 conocemos la magnetización por gramo de las partículas de  $Fe_3O_4$  recubiertas por dextrán a  $RT$ . Entonces, realizando el cociente entre el valor de magnetización obtenido para las levaduras magnéticas y la magnetización por gramo de partículas, obtenemos que la masa de partículas presente en la muestra es de  $4,9 \pm 0,2$  mg ( $0,25 \pm 0,01$  mg<sub>NP</sub>/mg<sub>levadura</sub>). Esto corresponde a la mitad de las partículas agregadas al cultivo.

## Capítulo 5

# Caracterización de las partículas sintetizadas

*“Trust the wait. Embrace the uncertainty. Enjoy the beauty of becoming. When nothing is certain, anything is possible.”*

— Mandy Hale.

### 5.0.1. Síntesis de partículas de Magnetita

Para esta primera síntesis, se utilizaron las cantidades que se enumeran a continuación:

- Acetil Acetonato Férrico ( $Fe(acac)_3$ ):  $4,24 \pm 0,01 \text{ g}$
- Oleilamina:  $8,0 \pm 0,1 \text{ ml}$
- Ácido Oleico (AO):  $8,0 \pm 0,1 \text{ ml}$
- Octanediol:  $0,331 \pm 0,001 \text{ ml}$
- Octadeceno:  $40,0 \pm 0,2 \text{ ml}$

Se abre la válvula que permite el ingreso de Nitrógeno para generar la atmósfera inerte, dejando una de las bocas del balón libre para eliminar la humedad. La manta térmica se encuentra prendida. A los  $120^\circ\text{C}$  se deja reaccionar durante 20 minutos y luego se coloca el condensador; de esta manera, se elimina parte del agua pero no toda, permitiendo la oxidación parcial de las partículas y -por lo tanto- la formación de



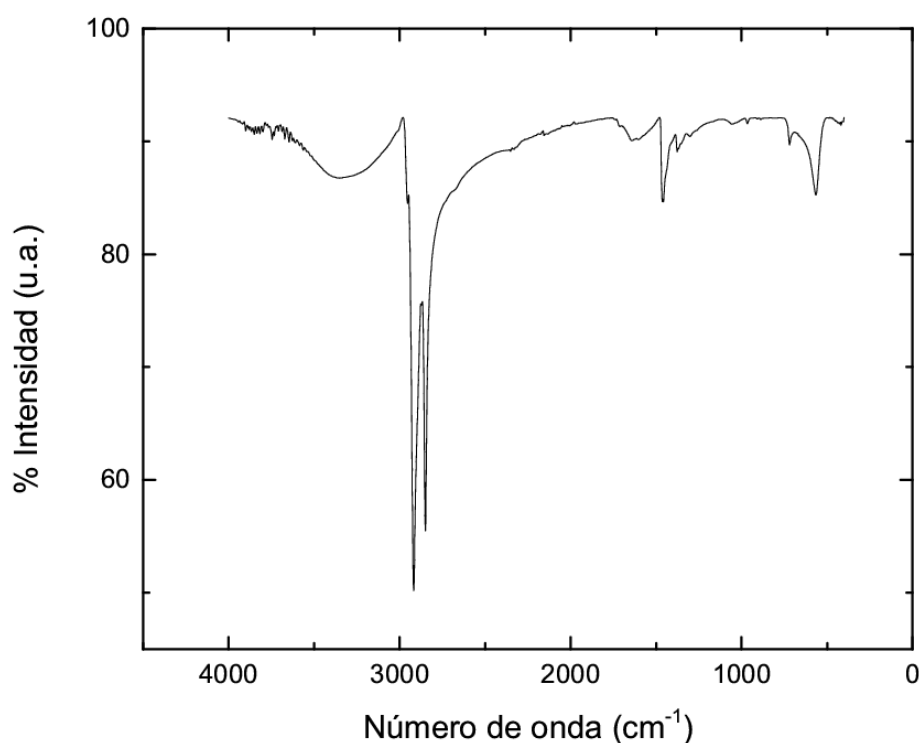
magnetita en la superficie sobre un *core* de wurstita. A los 200°C se sube al máximo la potencia de la manta térmica y se registra la temperatura durante una hora. A los 320 °C se visualizan explosiones del agua al condensar y reingresar a la síntesis. Pasado el tiempo, se retira la manta térmica y se deja enfriar.

## Caracterización

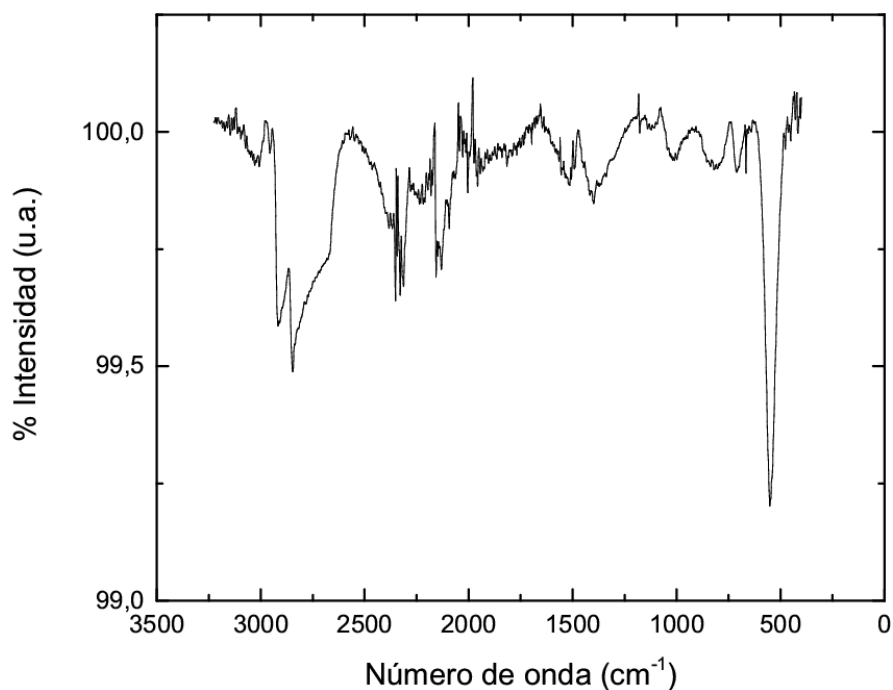
Se realizó el proceso de limpieza, pero la acetona se evaporó haciendo que el ácido oleico con la temperatura se tornara pegajoso. Se intentó repetir el proceso de limpieza, se intentó colocando detergente *Tween 20* y también con diclorometano (cloruro de metileno,  $CH_2Cl_2$ ).

A partir de este percance, se cubrió la muestra con dos capas de aluminio antes de ingresarla al horno a 40 °C.

Se logró remover el ácido oleico de las partículas y se procedió a la funcionalización de las mismas con dextrán.

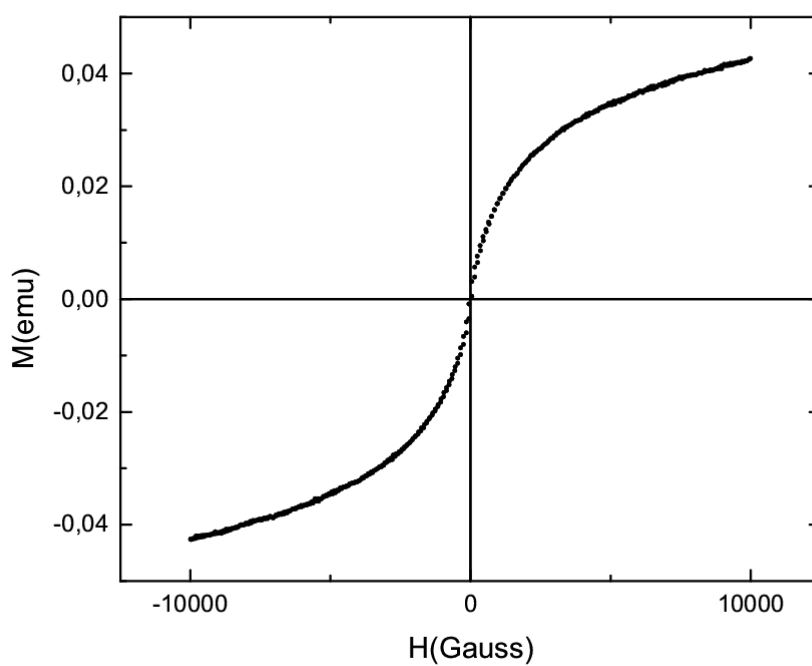


**Figura 5.1:** Espectro FTIR de partículas de magnetita en proceso de limpieza. Se observa todavía ácido oleico.



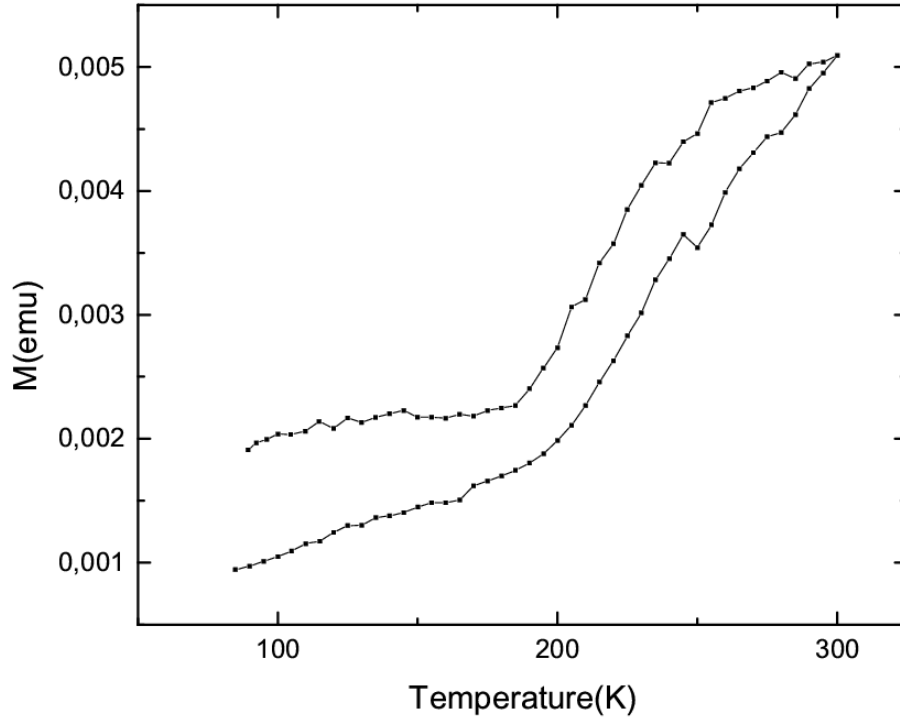
**Figura 5.2:** Espectro FTIR de partículas de magnetitas limpias.

Se realizó una caracterización magnética de estas partículas. Se observa su comportamiento superparamagnético en la Fig. 5.3, donde se muestra la magnetización del sistema en función del campo aplicado para una temperatura de 300 K.



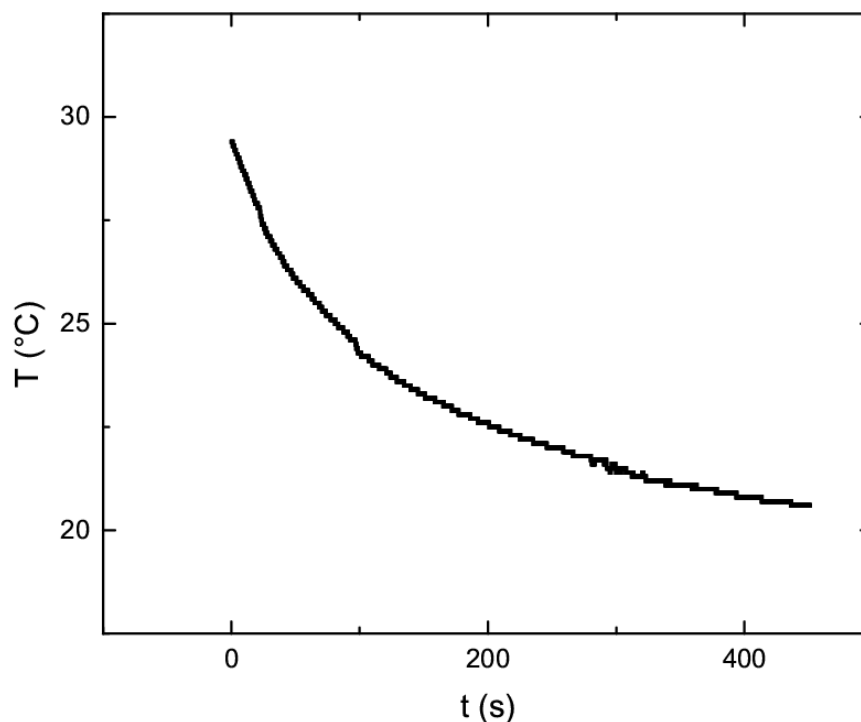
**Figura 5.3:** Magnetización en función del campo para temperatura de 300 K. Se observa el comportamiento superparamagnético.

La curva de magnetización en función de temperatura para un campo de 200 *Gauss*, Fig. 5.4, presenta dos pendientes bien diferenciadas. Este comportamiento se corresponde con la transición de Verwey.



**Figura 5.4:** Magnetización en función de temperatura para un campo de 200 *Gauss*. Se observa un cambio claro en el comportamiento debido a la transición de Verwey.

Se preparó una muestra de  $5,0 \pm 0,1$  *mg* de partículas en 1 *ml* de agua des ionizada y se colocó dentro del equipo de hipertermia. Se observa la medición en la Fig. 5.5. Estas partículas no subieron su temperatura sensiblemente.



**Figura 5.5:** Evolución de la temperatura de partículas de magnetita en una suspensión acuosa en función del tiempo para un campo AC de 200 Gauss.

### 5.0.2. Síntesis de partículas de Ferrita de Zinc (CatZn)

Buscando partículas de menor anisotropía para privilegiar el mecanismo de relajación de Neel, se sintetizaron partículas de *Ferrita de Zinc*,  $Zn_{0,2}Fe_{2,8}O_4$ .

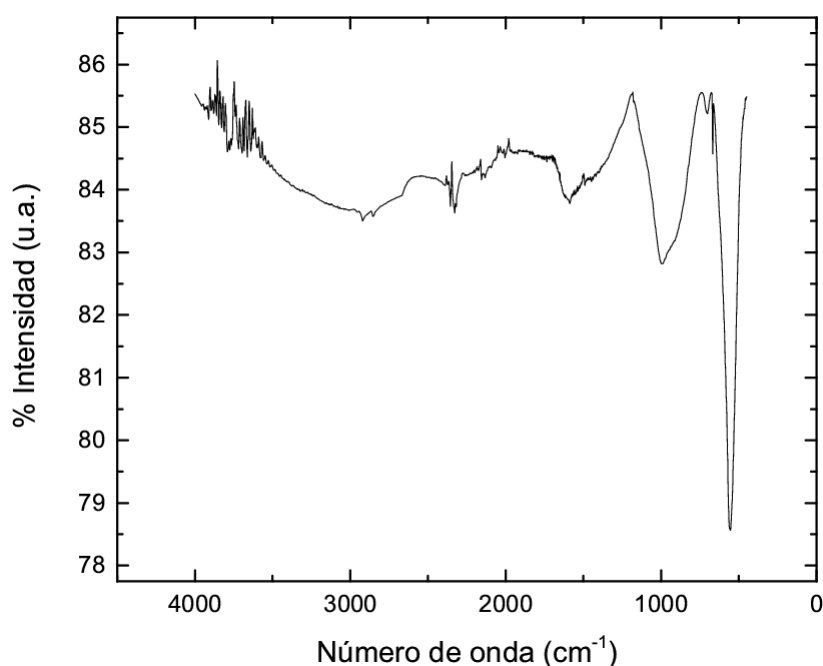
Este material presenta una fase ferrita. Se compone de una red *fcc* de Oxígenos, con  $Fe^{3+}$  y  $Zn$  en los intersticios tetragonales y  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  en los intersticios octaédricos. Existen 2 espacios octaédricos por cada tetragonal.

Para esta síntesis, se utilizaron las cantidades que se enumeran a continuación:

- Acetil Acetonato Férrico ( $Fe(acac)_3$ ):  $0,92 \pm 0,01$  g
- Oleilamina:  $0,81 \pm 0,01$  g
- Ácido Oleico (AO):  $2,55 \pm 0,01$  g
- Benzylether: 60 ml
- Octanediol:  $0,22 \pm 0,01$  g
- Zinc Acetyl Acetate Hydrate ( $Zn(acac)_2$ ):  $0,12 \pm 0,01$  g

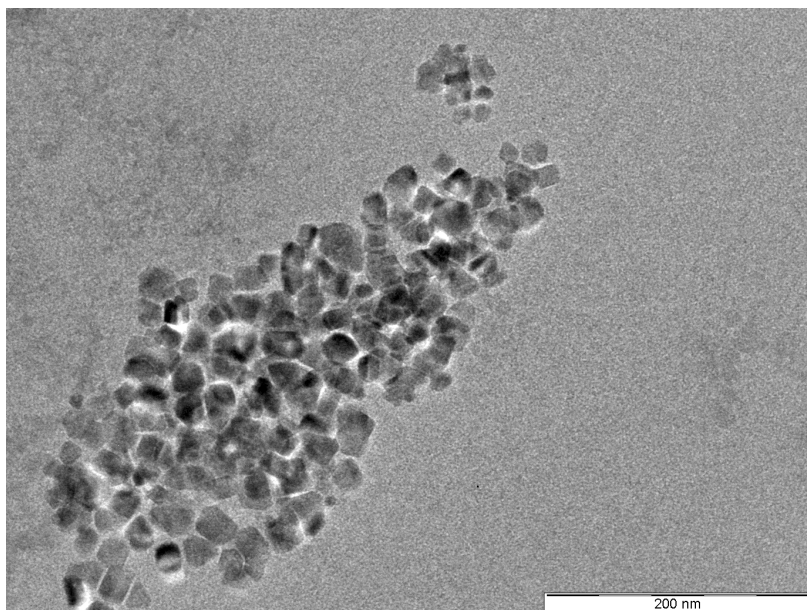
Al iniciar la síntesis, se abre la válvula que permite el ingreso de Nitrógeno para generar la atmósfera inerte, dejando una de las bocas del balón libre para eliminar la humedad. La manta térmica se encuentra prendida a 3/4 de potencia hasta alcanzar los 80 °C. Luego, se baja a mitad de potencia para que el sistema se estabilice en una temperatura cercana a los 100 °C. Se deja actuar durante 45 minutos y luego se coloca el condensador. Vuelve a subirse la potencia de la manta a 3/4 de su capacidad para llevar el sistema a 200 °C. Alcanzada esta temperatura, se deja reaccionar durante una hora. Luego, se coloca la manta térmica a máxima potencia y se cuenta una hora y media desde el inicio del reflujo. Concluido este tiempo, se retira la manta térmica y se deja enfriar. Luego de que la temperatura descienda 10 °C, se retira el condensador y se cierra el flujo de nitrógeno, de manera que las partículas se oxiden con la humedad que ingresa.

Se comprobó la funcionalización de las partículas mediante FTIR (Fig. 5.6). En este caso, se utilizó glucosa en lugar de dextrán por disponibilidad del laboratorio.



**Figura 5.6:** Espectro FTIR de partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa.

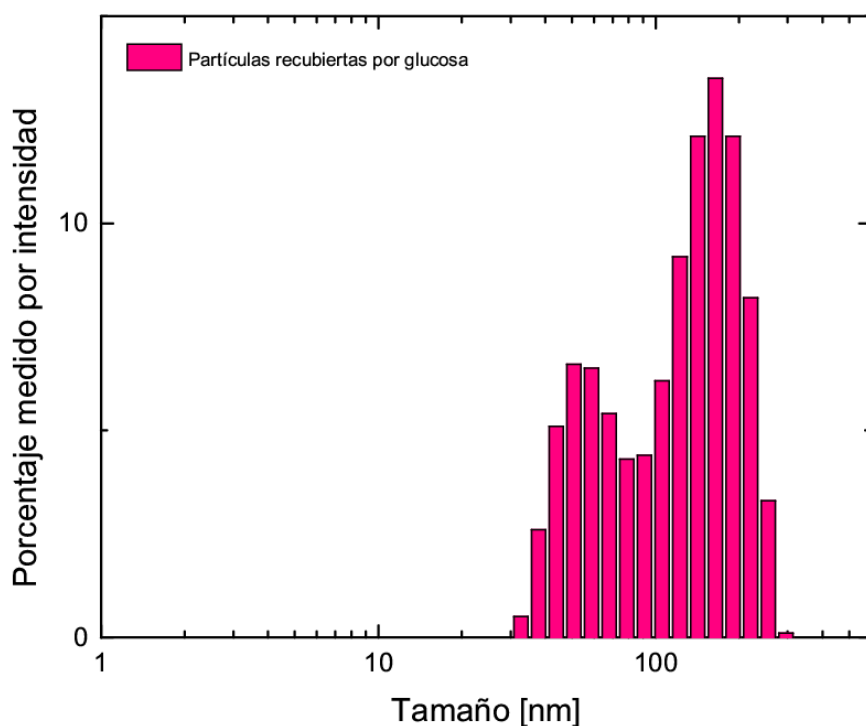
Estas partículas funcionalizadas se observaron en *TEM*, obteniendo la imagen que se presenta en la Fig. 5.7.



**Figura 5.7:** Imagen de las partículas de ferrita de zinc tomada por medio de TEM.

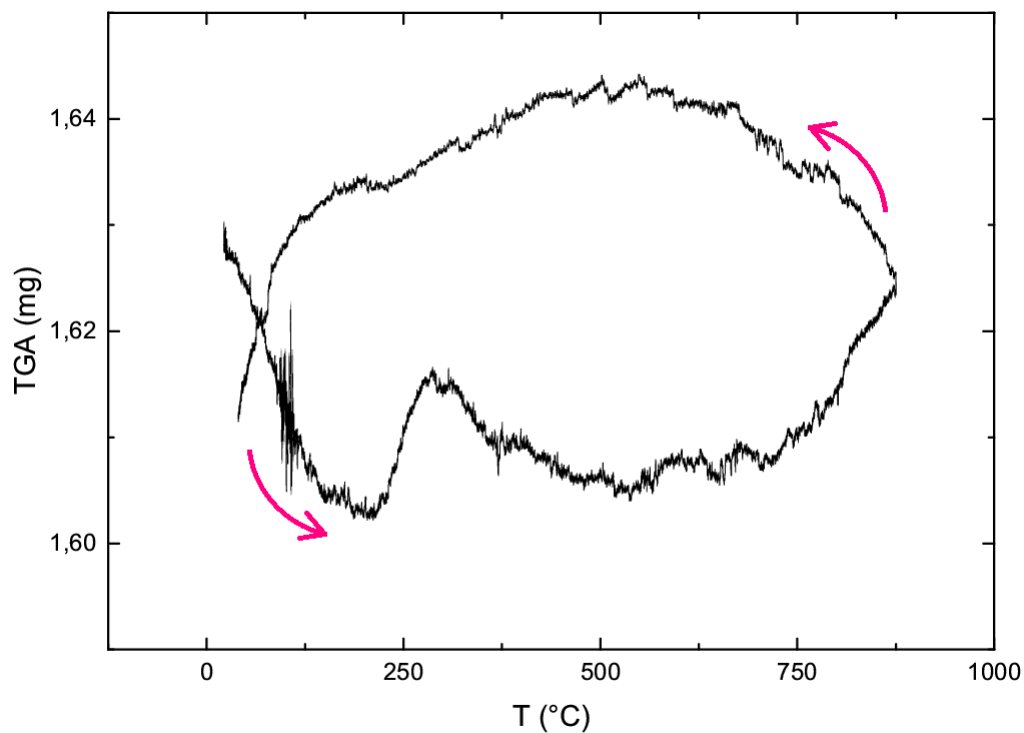
A partir de esta imagen, se midió el diámetro de las partículas, obteniendo un valor medio aproximado de  $23 \text{ nm}$ .

También se realizó una medición por dispersión de luz, presentada en la Fig. 5.8. De ella se observan dos diámetros característicos, en los valores de  $55,1 \pm 0,4 \text{ nm}$  y  $167,8 \pm 0,6 \text{ nm}$



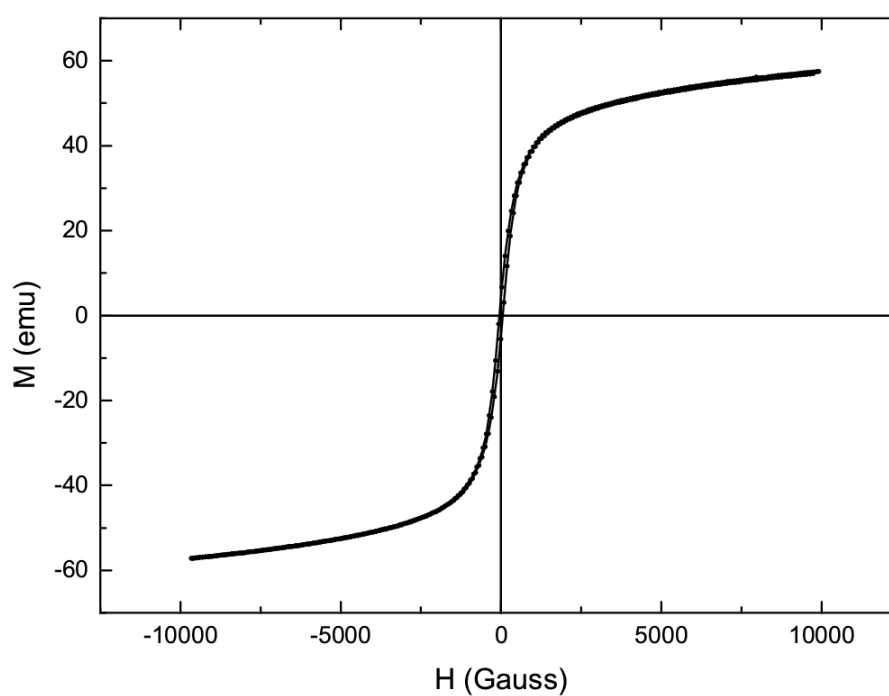
**Figura 5.8:** Medición mediante DLS de partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa. Se observan dos diámetros característicos.

Se estudiaron gravimétricamente estas partículas, obteniendo la medición que se presenta en la Fig. 5.9. De ella se concluye que las partículas funcionalizadas presentan un 1,84 % de materia orgánica.



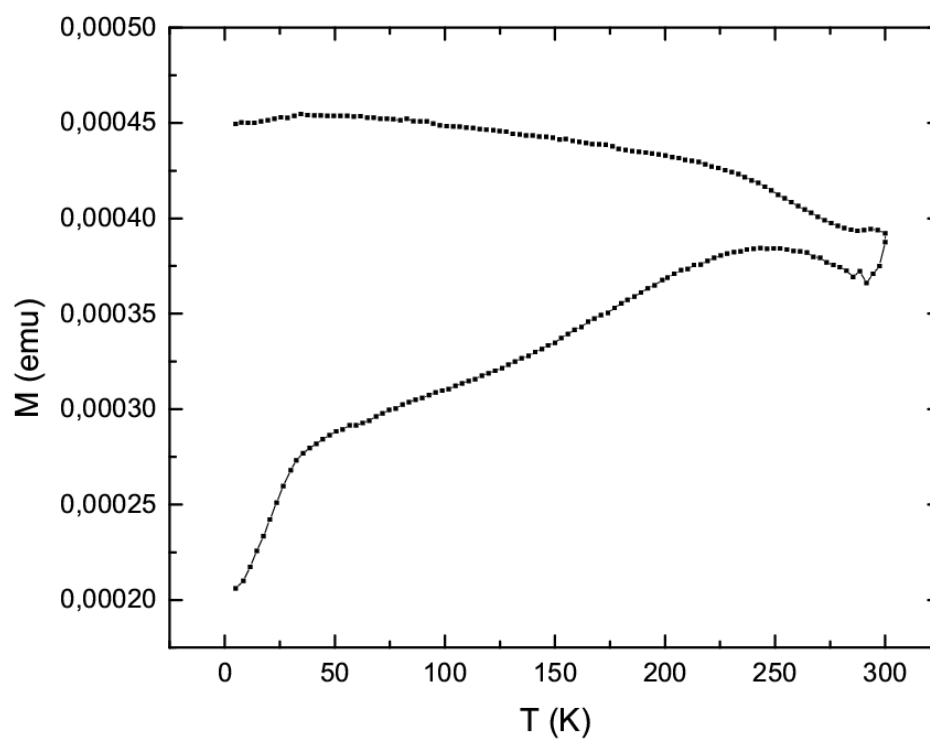
**Figura 5.9:** Termogravimetría realizada sobre partículas de ferrita de zinc funcionalizadas con glucosa.

Se estudió la magnetización en función del campo para temperatura de 300  $K$ , comprobando el comportamiento superparamagnético de las partículas.



**Figura 5.10:** Magnetización de partículas de ferrita de zinc en función del campo para una temperatura de 300 K.

Se midió la magnetización en función de la temperatura para un campo de 200 *Gauss* mediante el magnetómetro SQUID.



**Figura 5.11:** Magnetización de partículas de ferrita de zinc en función de la temperatura para un campo aplicado de 200 Gauss.

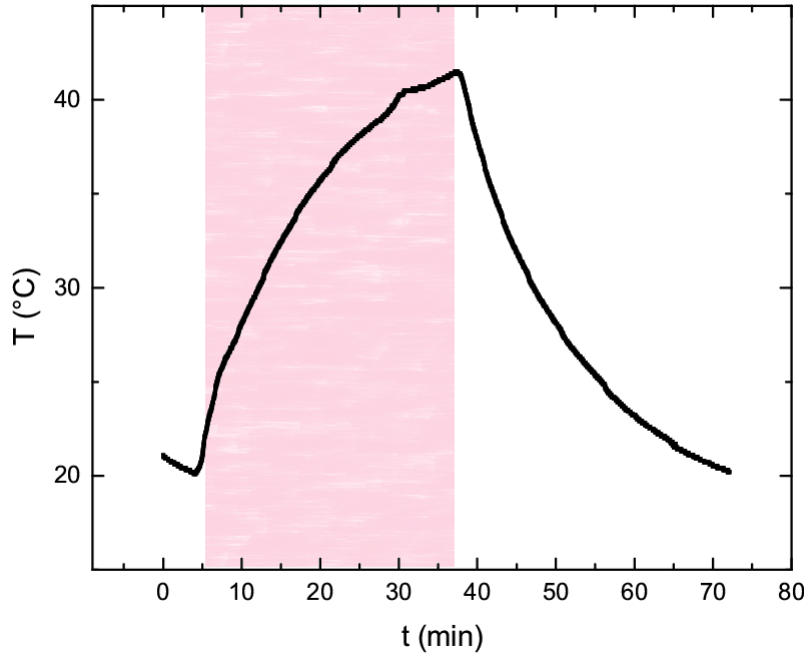


Midiendo el valor de  $T_B$  derivado de esta ecuación, se utilizó para calcular un valor estimativo de la anisotropía de las partículas. Para ello, valiéndonos de la Ec. 1.4, tenemos que

$$K = \frac{K_B T_B}{V} \ln \left( \frac{\tau_M}{\tau_0} \right) \quad (5.1)$$

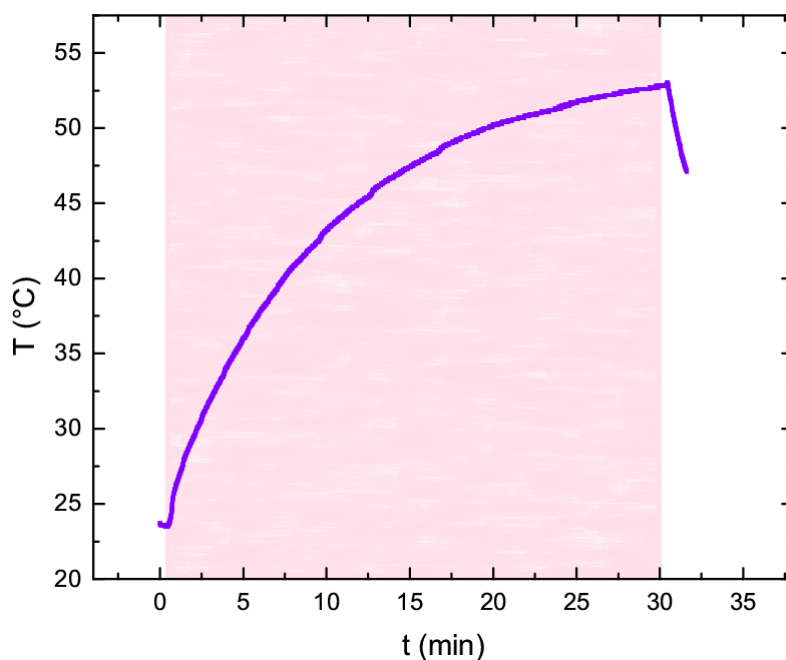
Considerando que  $\tau_M = 100 \text{ ms}$ ,  $\tau_0 = 10^{-10} \text{ ms}$ ,  $T = T_B = 137 \text{ K}$ ,  $V = 6,2 \times 10^{-18} \text{ cm}^3$  y  $K_B$  la constante de Boltzman, tenemos que  $K \sim 0,8 \times 10^5 \frac{\text{erg}}{\text{cm}^3}$

Se realizó un estudio de hipertermia magnética sobre estas partículas suspendidas en agua, obteniendo por resultado la medición presentada en la Fig. 5.12. Se observa un calentamiento de las partículas debido al campo magnético.



**Figura 5.12:** Medición de temperatura en función del tiempo para partículas de ferrita de zinc en agua al aplicar un campo magnético AC de 200 Gauss y 575 kHz. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

Se comprobó que este comportamiento no se viera alterado por el medio de cultivo, obteniendo la curva presentada en la Fig. 5.13. No se observó absorción por parte del medio.



**Figura 5.13:** Medición de temperatura en función del tiempo para partículas de ferrita de zinc en medio de cultivo YPD al aplicar un campo magnético AC de 200 Gauss y 575 kHz. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

Observando en detalle los primeros minutos en que se aplica el campo, puede apreciarse una zona *plateaux* de aproximadamente 40 segundos antes de comenzar a subir la temperatura. Este comportamiento se adjudica al efecto de interacciones magnéticas entre las partículas (formación de cadenas), correspondiente a la reorganización de las partículas debido al mecanismo de Brown, tanto rotando como trasladándose. La interacción entre las partículas y de éstas con el campo magnético favorece la agrupación en cadena, favoreciendo la interacción dipolar entre las partículas. Este fenómeno está siendo estudiado actualmente por la Lic. Daniela Valdés.[8]

## Capítulo 6

# Hipertermia magnética

*“The only real mistake is the one from which we learn nothing.”*

— Henry Ford.

Se siguió el protocolo de descongelado y siembra del cultivo celular. Se dejó crecer durante al menos 5 horas para luego agregar una cantidad conocida de nanopartículas *CatZn* suspendidas en agua a uno de los cultivos, y el mismo volumen de agua al otro. Se dispuso en las mismas condiciones de temperatura y agitación *ON*.

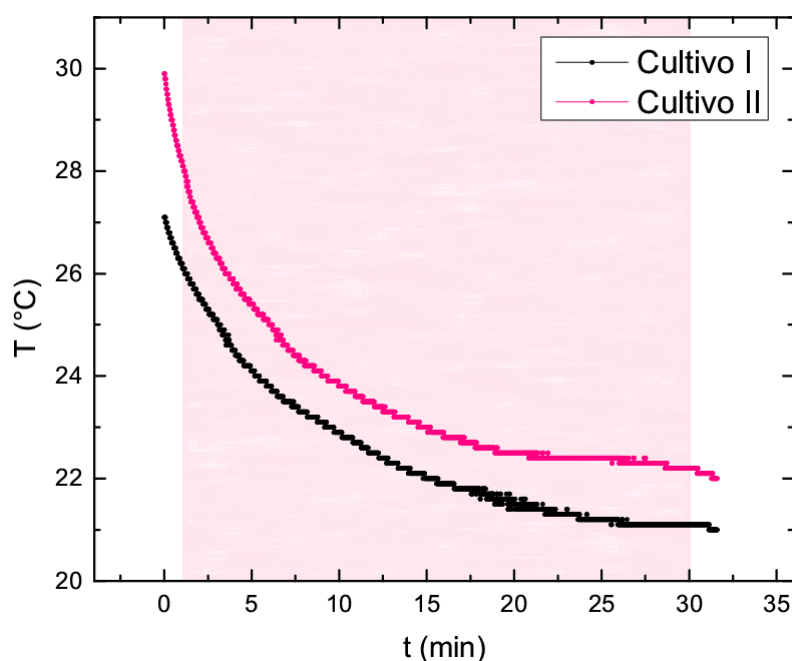
Para los ensayos de hipertermia siempre se separarán las muestras en:

- Cultivo control: cultivo de levaduras sin nanopartículas.
- Cultivo control-campo: cultivo de levaduras sin nanopartículas que pasará por el campo magnético AC.
- Cultivo toxicidad: cultivo de levaduras con nanopartículas que no será sometido al campo magnético AC.
- Cultivo hipertermia: cultivo de levaduras con nanopartículas que será sometido al campo magnético AC.

## 6.1. Primer ensayo

Al día siguiente se registró el valor de OD del cultivo. La cantidad de partículas agregada al cultivo fue de  $4,1 \pm 0,2 \text{ mg}$ .

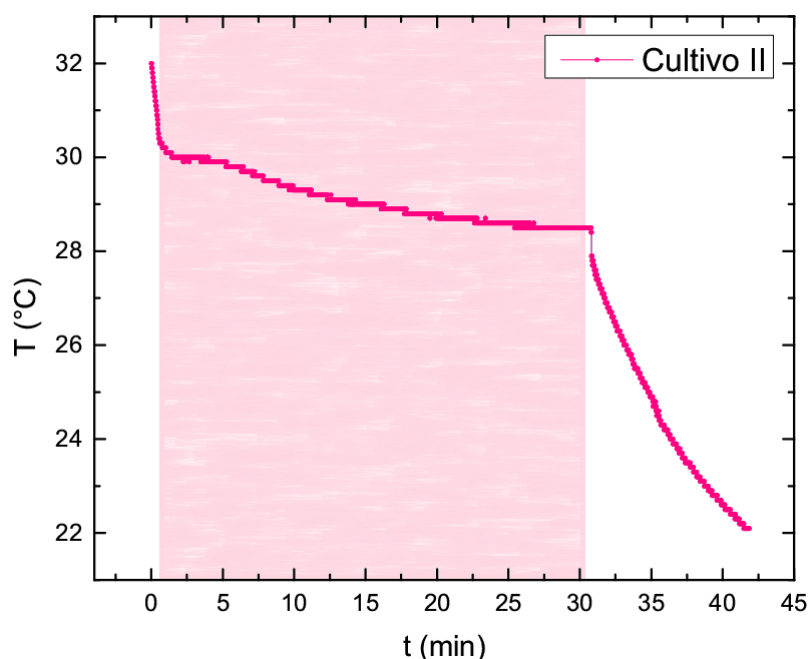
Se tomó  $1 \text{ ml}$  de cultivo y se dispuso durante  $20 \text{ minutos}$  en un campo magnético AC de  $200 \text{ Gauss}$  de amplitud y  $575 \text{ kHz}$  de frecuencia. El resultado obtenido se presenta en la Fig. 6.1, donde se observa un enfriamiento de la muestra que no difiere entre la muestra con partículas y la muestra de cultivo sin partículas.



**Figura 6.1:** Evolución de la temperatura en función del tiempo sobre una alícuota de cada cultivo. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

## 6.2. Segundo ensayo

Se centrifugó el cultivo para concentrar las células y las partículas. Se quitó el sobrenadante y se dispuso la muestra en un campo de las mismas características que en la primera prueba. El resultado se presenta en la Fig. 6.2. En este caso, si bien se observó un enfriamiento de la muestra, la temperatura descendió aproximadamente  $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en  $30 \text{ minutos}$ , mientras que sin campo la temperatura desciende  $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en tan sólo  $5 \text{ minutos}$ . Este hecho es una muestra de que las partículas generan un calentamiento local, si bien no es suficiente para superar la disipación del calor al ambiente.



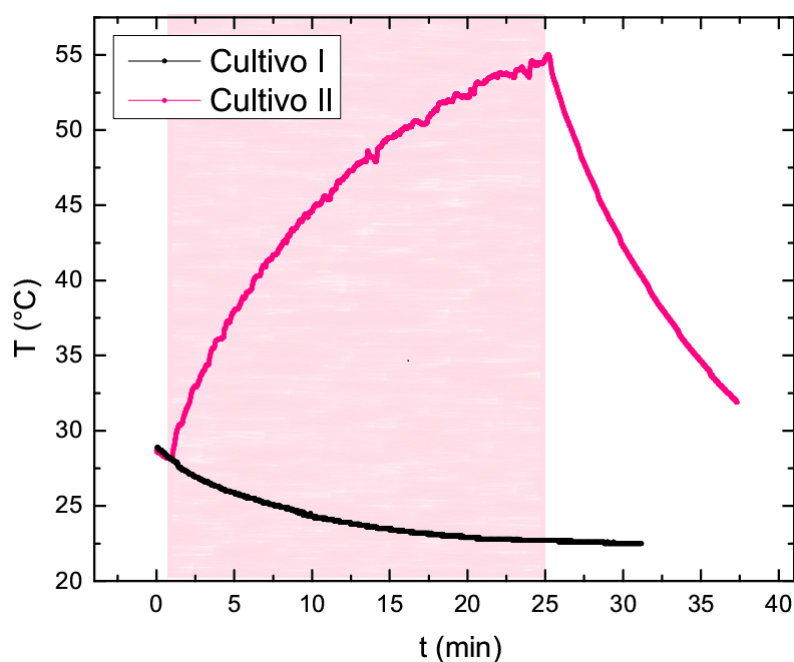
**Figura 6.2:** Evolución de la temperatura en función del tiempo para el cultivo II centrifugado. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

Basándonos en este resultado, se hizo un cálculo sobre la potencia entregada por las partículas para realizar un nuevo experimento con una mayor cantidad de partículas. Se decidió entonces agregar el doble de partículas en un nuevo experimento.

### 6.3. Tercer ensayo

Se realizó el protocolo de descongelado y cultivo celular. Esta vez se agregaron  $8,5 \pm 0,2 \text{ mg}$  de nanopartículas al cultivo y se dispuso *ON* a  $37^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ RPM}$ .

Se centrifugó la muestra y se colocó en un campo magnético AC de  $200 \text{ Gauss}$  de amplitud y  $575 \text{ kHz}$  de frecuencia. El resultado obtenido se presenta en la Fig. 6.3. Se observa nuevamente una zona *plateaux* del orden de medio minuto; esta vez hubo un aumento considerable en la temperatura, alcanzando los  $55^\circ\text{C}$ . El experimento se detuvo a esta temperatura por temor a que el cultivo aumentara su viscosidad y se pegara a la delicada fibra óptica con que se mide la temperatura.



**Figura 6.3:** Evolución de la temperatura en función del tiempo para los cultivos centrifugados. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

Se tomó una alícuota de 0,5 *ml* de este cultivo concentrado y se resuspendió en 10 *ml* de *YPD*. Luego, se tomó una alícuota de 0,5 *ml* de este cultivo, se centrifugó y se resuspendió en 1 *ml* de azul de metileno al 1 %. Se observó en microscopio y no se observaron células teñidas. Se repitió esta medición cada una hora, durante 6 horas sin observar resultados positivos de tinción.

Por información obtenida de literatura, se sospechó que este comportamiento se debiera a la acción de *Heat Shock Proteins*[9],[10]. Estos estudios indican que las levaduras cultivadas a 37 °C generan resistencia a la temperatura, por lo que podrían no haber muerto.

Sin embargo, posteriormente se analizó en detalle el experimento realizado y se halló un error en la aplicación del protocolo, ya que la concentración celular del cultivo utilizado es, según el valor de *OD* medido, de  $50 \times 10^6$   $\bar{c}/ml$  mientras que la densidad requerida para el protocolo es de  $0,5 \times 10^6$   $\bar{c}/ml$ .

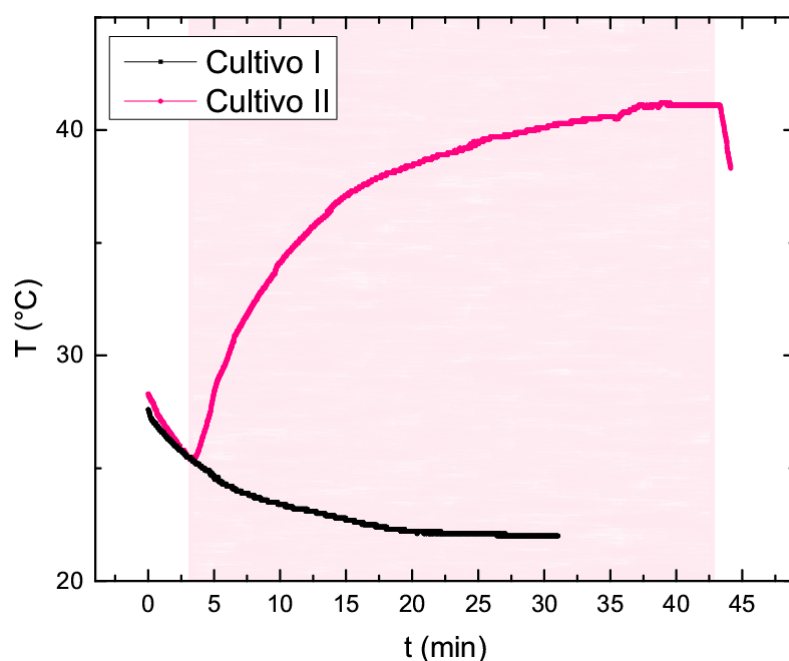
## 6.4. Cuarto ensayo

Considerando la posibilidad de que las células generaran resistencia al calor, se realizó el protocolo de descongelado y cultivo celular cambiando la temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se agregó la misma cantidad de nanopartículas,  $8,5 \pm 0,2\text{ mg}$  y se dejó el cultivo *ON*.

Al día siguiente se midió *OD* y se observó que la densidad celular resultó notablemente menor a los cultivos anteriores.

Se centrifugó y se tomó el *pellet* para aplicar el campo magnético AC de las mismas magnitud y frecuencia que en la prueba anterior. En el proceso se observó que parte de las partículas quedaron pegadas a la superficie interna del tubo tipo falcon en que se realizó el proceso de centrifugado.

El resultado de aplicar el campo magnético a la muestra se presenta en la Fig. 6.4 donde puede observarse que la temperatura asciende hasta los  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , luego de haber pasado por un *plateaux* de 42 segundos. Se intentó volver a aplicar el campo enseguida para que la muestra no se enfriara notablemente y comprobar si la temperatura podía ascender a valores similares a la prueba anterior, pero por un error en el software no se pudo realizar a la velocidad pretendida. Se repitió el experimento y se alcanzó la temperatura de  $40,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 6.4:** Evolución de la temperatura en función del tiempo para los cultivos centrifugados. La sección coloreada indica el tiempo en que el campo fue aplicado.

Se resuspendió una alícuota de  $0,25\text{ ml}$  del cultivo concentrado en  $5\text{ ml}$  de medio *YPD*. Se realizó un conteo celular para aplicar rigurosamente el protocolo de viabilidad. Considerando el valor de densidad celular, se centrifugó una alícuota de la cual se espera obtener un pellet con  $0,5 \times 10^6\text{ c}$  para resuspender en  $1\text{ ml}$  de azul de metileno al  $1\%$ . Se observaron células teñidas, se realizó el conteo y se obtuvo una relación del  $56\%$  de células teñidas en el total, mientras que en el cultivo sin partículas no se pudieron contar células teñidas por no tener la cantidad mínima requerida.

Se realizó el mismo proceso sobre la muestra de cultivo con partículas que no fue sometida al campo magnético y el resultado de células teñidas corresponde al  $0,01\%$  de células totales, correspondiente a muerte por toxicidad.

Por último, para evaluar el efecto de la temperatura sobre las células, se colocó  $1\text{ ml}$  de cultivo de densidad  $0,5 \times 10^6\text{ c/ml}$  en un bloque térmico a  $42^\circ\text{C}$  durante  $5\text{ minutos}$ . Se centrifugó  $0,5\text{ ml}$  y se resuspendió el pellet en  $1\text{ ml}$  de azul de metileno al  $1\%$ . En este caso, la mortalidad celular corresponde al  $0,03\%$  de las células totales, por lo que esta temperatura no alcanza para generar la apoptosis celular. Se sospecha entonces que la muerte producida sobre el cultivo anterior se debe en parte a un calentamiento localizado mucho mayor al calentamiento global medido, y a la generación de especies reactivas del oxígeno. [11]



# Capítulo 7

## Conclusiones

*“It’s sad to know I’m done. But looking back, I’ve got a lot of great memories.”*

— Bonnie Blair

### Síntesis y funcionalización de Nanopartículas

Por el método de síntesis, las partículas inicialmente están recubiertas por ácido oleico. Es posible quitar este recubrimiento mediante procesos químicos con etanol, metanol y acetona, y luego recubrirlas con dextrán o glucosa. Al recubrir las partículas, la interacción entre ellas resulta menor que al estar recubiertas por ácido oleico. De esta manera, los cúmulos formados contendrán aproximadamente 1 - 4 unidades en el caso de partículas funcionalizadas, en contraposición de los 50 en el caso de estar recubiertas por ácido oleico.

### Partículas de magnetita

Las partículas de magnetita presentan mayoritariamente un comportamiento superparamagnético con una pequeña histéresis por la presencia de algunas partículas de mayor tamaño. Se pudo observar la transición de Verwey para temperaturas entre 100 y 150 °C. Estas partículas no presentan un calentamiento notable por hipertermia magnética.

## Partículas de ferrita de zinc

Pudieron sintetizarse correctamente partículas de ferrita de zinc de aproximadamente 23 nm de diámetro, funcionalizadas con glucosa. Su anisotropía es de  $K = 0,8 \times 10^5 \text{ erg/cm}$  y generan un calentamiento considerable por hipertermia. En la curva de temperatura en función del tiempo se observa una zona *plateaux* antes de empezar a aumentar la temperatura que se atribuye a un ordenamiento de las partículas por el mecanismo de Brown, agrupándose en forma de cadenas.

## Modelo celular

El medio de cultivo elegido, YPD, y las condiciones de temperatura de 37 °C y agitación de 200 RPM resultan apropiadas para el crecimiento de *saccharomyces cerevisiae*. Se seleccionó una colonia que diera lugar a la línea celular a utilizar a lo largo de toda la tesis. Se cultivó y se conservó en nitrógeno líquido. Este preparado puede utilizarse para generar nuevos cultivos siguiendo un protocolo de descongelado y siembra celular descrito en la Sección 3.4

Se estudió la curva de crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo una relación entre la densidad celular y el OD de la forma

$$\delta \left[ \frac{\bar{c}}{ml} \right] = \frac{(OD[Abs] - 0,14) \times 10^8}{4,95} \quad (7.1)$$

.

A partir de este resultado, se pudo utilizar la medición de OD para cuantificar la densidad celular de los cultivos.

## Prueba de concepto

En una primera etapa de esta tesis, se realizó una prueba de concepto en la que pudieron separarse levaduras con comportamiento magnético, verificando así la incorporación de las partículas a las células.

## Hipertermia

Se desarrolló un protocolo de viabilidad mediante el uso del colorante orgánico *Azul de Metileno*. Puede estudiarse la viabilidad celular a partir de la suspensión de  $0,5 \times 10^6$  células en 1 ml de azul de metileno en solución acuosa al 1 % y dejando reaccionar durante 1 minuto. Las células metabólicamente activas reducen el colorante, mientras que aquellas axénicas se tiñen de azul. Mediante este protocolo se estudió la toxicidad de partículas de ferrita de zinc, observando una mortalidad del 0,003 % luego de haber agregado 8,5 mg de partículas a 20 ml de cultivo ON.

Se cultivaron levaduras a 37 °C, incorporando 8,5 mg partículas CatZn en la fase exponencial de crecimiento. Se centrifugó el cultivo y se observó un aumento de la temperatura inducido por el campo magnético alterno. Sin embargo, no se observó muerte celular. Esto puede atribuirse a que las levaduras generaran resistencia al calor como forma de adaptación debido a las condiciones de cultivo. Sin embargo, por un error en la aplicación del protocolo de viabilidad, no puede asegurarse que no se haya provocado la muerte celular en el cultivo.

Por último, suponiendo la resistencia al calor generada por las condiciones de cultivo, se descongeló y sembró un nuevo cultivo, esta vez a 20 °C. Se agregó la misma cantidad de partículas que en el ensayo anterior, se centrifugó el cultivo y se observó un aumento en la temperatura generado por la hipertermia magnética. En este cultivo se registró un 56 % de mortalidad debido a la hipertermia y tan solo un 0,003 % debido a la toxicidad. Sin embargo, las mismas células llevadas a la misma temperatura mediante un bloque térmico no presentan mortalidad cuantificable. Esto indicaría entonces que la muerte inducida en el caso de hipertermia magnética se deba a un aumento en la temperatura localizado, siendo mucho mayor la temperatura alcanzada que la medida globalmente en el sistema, o a la generación de especies reactivas del oxígeno.

# Bibliografía

- [1] Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **36** (13), R167, 2003. [1](#)
- [2] Piscioti, M. L. M., Lima, E., Mansilla, M. V., Tognoli, V. E., Troiani, H. E., Pasa, A. A., *et al.* In vitro and in vivo experiments with iron oxide nanoparticles functionalized with DEXTRAN or polyethylene glycol for medical applications: Magnetic targeting. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **102** (4), 860–868, jan 2014. URL <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33068>. [1](#)
- [3] Adny H. Silva, Enio Lima Jr, Mansilla, M. V., Zysler, R. D., Troiani, H., Piscioti, M. L. M., Locatelli, C., Benech, J. C., Oddone, N., Zoldan, V. C., Winter E., Pasa, A. A., Creczynsky, T. B. Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles mpeg350- and mpeg2000-coated: cell uptake and biocompatibility evaluation. *Elsevier. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.*, págs. 909 – 919, December 2015. [1](#)
- [4] Kittel, C. Introduction to solid state physics, 2004. [2](#)
- [5] Zhila Shaterabadi, M. S., Gholamreza Nabiyouni. Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy. *Elsevier, Vol. 133*, págs. 9–19, March 2018. [5](#)
- [6] Yeast extract–peptone–dextrose (YPD) medium (liquid or solid). *Cold Spring Harbor Protocols*, **2017** (8), pdb.rec090563, aug 2017. [14](#)
- [7] Walz, F. The verwey transition - a topical review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, págs. 14 (12): R285–R340, March 2002. [21](#)
- [8] Valdés, D. P. Modelando el efecto de las interacciones dipolares en cadenas de nanopartículas para hipertermia magnética, Noviembre 2018. [45](#)

- 
- [9] Kalyuzhin, V. A. Heat resistance in *saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biology Bulletin Reviews, Vol I*, págs. 207–213, May 2011. [49](#)
- [10] Lee McAlister, D. B. F. Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *ELSEVIER, Biochemical and Biophysical Research Communications*, págs. 819–824, April 1980. [49](#)
- [11] Moreno Maldonado, A. C. Actividad tipo peroxidasa de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  para hipertermia de fluido magnético., Diciembre 2017. [51](#)

# Agradecimientos

*“There is a voice that doesn’t use words. Listen.”*

— Rumi.

A Roberto, que desde su posición de director me guió con paciencia infinita en cada paso de este trabajo. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por la disponibilidad en todo momento -incluso en las semanas imposibles!-, por transmitirme tu alegría en el trabajo y tu constante buen humor.

A Enio, que me acompañó en cada síntesis y funcionalización. Gracias por responder cada pregunta 20 veces, por entusiasmar me con cada avance y transmitirme ese entusiasmo en el laboratorio.

A Carolina, por dedicarme su tiempo generosamente. Gracias por estar siempre presente y pendiente de mi trabajo, por repasar conmigo cada detalle de los protocolos, por festejar conmigo y hacer que el trabajo sea súper agradable.

Me siento inmensamente agradecida de haber tenido la oportunidad de trabajar con estos tres profesionales increíbles, que -además- son excelentes personas. Gracias por su paciencia y su alegría; me llevo enseñanzas mucho más allá de lo académico.

Agradezco a mi familia que estuvo presente en cada parte del recorrido, que supieron entender mis silencios y ausencias por el estudio y se alegraron conmigo en cada logro. Gracias por cada detalle y cada palabra de aliento.

A mi compañero de vida, Juan, que me acompañó en todo el recorrido. Gracias por bancarte mis nervios y “maratones de estudio”, por darme ánimos y chocolate, por estar siempre. Por escucharme repasar materias que nunca viste, practicar mis charlas, por criticarme y ayudarme a mejorar. Te amo.

A mis suegros y cuñados. Gracias por sumar siempre unos buenos mates, un poco de risas y relax entre mis tareas.

A Lola y Pedro. Gracias por estar pendientes acompañándome en mi carrera, por los mates “cuando podemos” y el cariño incondicional.

A mi amiga Tamara, por estar siempre. Gracias por acompañarme sin importar la distancia, por sacar lo mejor de mí y ayudarme a tener perspectiva cuando me abruma el estudio.

A mi amigo Panchito, mi compañero de estudio. Gracias por enseñarme lo que es estudiar en equipo, por ser un pilar fundamental en mi vida y por seguir acompañándome en los últimos años a pesar de la distancia.

Dani, mi fiel amiga y compañera. Gracias por tanto, por estar siempre, por cada risa, por cada apunte, por cada charla. Gracias por darme ánimos siempre, por festejar conmigo cada logro. Estoy súper agradecida por haber compartido no sólo las aulas sino también el grupo en el que hacer nuestras tesis.

Natalia Piunno, “Nati Moscas”. Gracias por enseñarme a vivir la vida con humor, por compartir almuerzos y risas. Por enseñarme que no hay nada que sea tan grave, que si uno se pierde sólo tiene que doblar... y a algún lado se llega.

A Yasuo y a Nicolás, que sin pedir ningún tipo de reconocimiento fueron mis tutores en los momentos más complicados de mi carrera. Gracias por ser excelentes amigos y por transmitirme paz en cada charla. Agradezco haber conocido a dos personas tan sabias, mucho más allá de lo académico.

A Pablo Esteban, un gran amigo. Por acompañarme desde su simpleza en almuerzos o charlas de pasillo. Por darme ánimos siempre y hacerme reír con sus ocurrencias. A Dana, por tener siempre un oído atento. A mis amigas del *Manso miedo*, por hacer que mi paso por el instituto sea mucho más agradable. A mis amigos *de la cuadra*, por esos cortes de semana alegres en los que reponer fuerzas para seguir.

A mis amigos fuera del instituto, que supieron entender que mis tiempos estuvieran dedicados prioritariamente al estudio. Por acompañarme, por darme ánimos, por alegrarse conmigo, por disfrutar los encuentros siempre que se pudiera y por no ofenderse cuando estaba ocupada.

A Panchi y a Eduardo. Gracias por ayudarme desde sus profesiones a dar lo mejor de mí.

A mis profesores, por enseñarme cómo quiero ser el día que me toque estar del otro lado. En particular a Vivi Ramirez, por quien siento un cariño especial y que representa el modelo de profesora que espero llegar a ser.